

**ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL**  
(FOR EVALUATION OF THE ACT DOCTORAL THESIS)

Año académico (academic year): 2016/17

DOCTORANDO (candidate PHD): GUTIÉRREZ HERNÁNDEZ, SARA

PROGRAMA DE DOCTORADO (Academic Committee of the Programme): D348 DOCTORADO EN QUÍMICA FINA

DEPARTAMENTO DE (Department): QUÍMICA ORGÁNICA Y QUÍMICA INORGÁNICA

TITULACIÓN DE DOCTOR EN (Phd title): DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

En el día de hoy 23/06/17, reunido el tribunal de evaluación, constituido por los miembros que suscriben el presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral **con Mención Internacional** (In today assessment met the court, consisting of the members who signed this Act, the candidate defended his doctoral thesis with mention as International Doctorate), elaborada bajo la dirección de (prepared under the direction of) JUAN J. VAQUERO LÓPEZ // DAVID SUCUNZA SÁENZ.

Sobre el siguiente tema (Title of the doctoral thesis): DESARROLLO DE METODOLOGÍA SINTÉTICA PARA LA OBTENCIÓN DE AZINAS, AZOLES Y ALCALOIDES CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL<sup>1</sup> de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente) (After the defense and defense of the thesis, the court agreed to grant the GLOBAL RATING (fail, pass, good and excellent): **SOBRESALIENTE**

Alcalá de Henares, a 23 de junio de 2017

Fdo. (Signed):

Fdo. (Signed):

Fdo. (Signed):

FIRMA DEL ALUMNO (candidate's signature),

Fdo. (Signed):

Con fecha 29 de junio de 2017 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- ☒ Conceder la Mención de "Cum Laude"  
☐ No conceder la Mención de "Cum Laude"

La Secretaria de la Comisión Delegada

<sup>1</sup> La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad. (The grade may be "fail" "pass" "good" or "excellent". The panel may confer the distinction of "cum laude" if the overall grade is "Excellent" and has been awarded unanimously as such after secret voting.).

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:  
(Incidents / Comments)





En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 29 de junio, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por GUTIÉRREZ HERNÁNDEZ, SARA, el día 23 de junio de 2017, titulada *DESARROLLO DE METODOLOGÍA SINTÉTICA PARA LA OBTENCIÓN DE AZINAS, AZOLES Y ALCALOIDES CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado resuelve otorgar a dicha tesis la

***MENTIÓN "CUM LAUDE"***

Alcalá de Henares, 11 julio de 2017  
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ESTUDIOS  
OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO



Firmado digitalmente por VELASCO  
PEREZ JUAN RAMON - DNI  
03087239H  
Fecha: 2017.07.12 15:43:51 +02'00'

Juan Ramón Velasco Pérez

Copia por e-mail a:

Doctorando: GUTIÉRREZ HERNÁNDEZ, SARA

Secretario del Tribunal: CAROLINA BURGOS GARCÍA.

Directores de Tesis: JUAN J. VAQUERO LÓPEZ // DAVID SUCUNZA SÁENZ



Universidad  
de Alcalá

ESCUELA DE DOCTORADO  
Servicio de Estudios Oficiales de  
Posgrado

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D<sup>a</sup> \_\_\_\_\_  
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo  
presentado la misma en formato: ☐ soporte electrónico ☐ impreso en papel, para el depósito de la  
misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el nº de páginas: \_\_\_\_\_ se procede, con  
fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

Alcalá de Henares a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_



Fdo. El Funcionario





Programa de Doctorado en Química Fina

**Desarrollo de metodología sintética  
para la obtención de azinas, azoles  
y alcaloides con actividad biológica**

Tesis doctoral presentada por

**Sara Gutiérrez Hernández**

Directores: Prof. Dr. Juan José Vaquero López  
Dr. David Sucunza Sáenz

Alcalá de Henares, 2017





Programa de Doctorado en Química Fina

**Desarrollo de metodología sintética  
para la obtención de azinas, azoles  
y alcaloides con actividad biológica**

Tesis doctoral presentada por

**Sara Gutiérrez Hernández**

Directores: Prof. Dr. Juan José Vaquero López  
Dr. David Sucunza Sáenz

Alcalá de Henares, 2017





Universidad  
de Alcalá

DEPARTAMENTO DE  
QUÍMICA ORGÁNICA Y QUÍMICA  
INORGÁNICA

Edificio de Farmacia – Campus Universitario

Carretera Madrid-Barcelona, km 33,600

28805 Alcalá de Henares (Madrid)

[dpto.quimorinor@uah.es](mailto:dpto.quimorinor@uah.es)

La **Dra. Carolina Burgos García**, Profesora Titular de Universidad y Directora del Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá,

**CERTIFICA:** Que **Dña. Sara Gutiérrez Hernández**, Licenciada en Química por la Universidad de Salamanca, ha realizado en el Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá bajo la dirección del **Prof. Dr. Juan José Vaquero López** y del **Dr. David Sucunza Sáenz** el trabajo experimental recogido en la presente Memoria y titulado:

### **Desarrollo de metodología sintética para la obtención de azinas, azoles y alcaloides con actividad biológica**

y autoriza su presentación para optar al grado de Doctor en Química Fina por la Universidad de Alcalá.

Y para que así conste, firma el presente certificado.

Alcalá de Henares, Abril de 2017

Fdo. Carolina Burgos García





Los abajo firmantes, **Dr. David Sucunza Sáenz**, Profesor Titular Interino del Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá y **Prof. Dr. Juan José Vaquero López**, Catedrático del Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá,

**CERTIFICAN:** Que la Memoria presentada por **Dña. Sara Gutiérrez Hernández**, con el título:

**Desarrollo de metodología sintética para la obtención de azinas, azoles y alcaloides con actividad biológica**

ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá, y autorizan su presentación para optar al grado de Doctor en Química Fina por la Universidad de Alcalá.

Y para que así conste, firman el presente certificado.

Alcalá de Henares, Abril de 2017



Fdo. Juan José Vaquero López



Fdo. David Sucunza Sáenz





La realización de una tesis doctoral conlleva mucho esfuerzo, momentos de frustración cuando las cosas no salen, y de satisfacción cuando por fin logras tus metas. Por ello, me gustaría agradecer a todas aquellas personas que me han acompañado durante este camino y que, de un modo u otro, han contribuido a la realización de esta tesis.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de tesis: el Prof. Juan José Vaquero, por abrirme las puertas a la investigación al permitirme formar parte de su grupo y por ayudarme siempre que lo he necesitado, y el Dr. David Sucunza, por estar siempre ahí, guiarme y aconsejarme día a día. Además me gustaría agradecer a ambos el apoyo y la confianza depositada en mí durante estos cuatro años.

Hago extensivo mi agradecimiento al Prof. Julio Álvarez-Builla y los demás profesores del departamento, en especial a las Dras. Carolina Burgos, Ana M<sup>a</sup> Cuadro, M<sup>a</sup> Luisa Izquierdo y Patricia García, y el Dr. Ramón Alajarín, así como al resto de profesores del grupo de investigación, por su interés y consejos.

A la Universidad de Alcalá, por la concesión de una beca predoctoral, así como la ayuda para la realización de una estancia predoctoral.

Un agradecimiento especial a los Profs. Narciso Martín y David Díez, de la Universidad de Salamanca, por contagiarme su entusiasmo por la química orgánica y permitirme dar mis primeros pasos en su laboratorio, así como a los compañeros del laboratorio con los que compartí tantos buenos ratos en Salamanca: Carlos, Aitor, Isa, Merce, etc., y de forma especial a Carmen y Mateo, mis químicos orgánicos favoritos y dos de los mejores amigos que uno puede tener: por todos esos momentos durante la carrera y después de la misma, aunque nuestros caminos se hayan separado espero que el tiempo siga sin pasar por nosotros y no perdamos esta amistad.

Al Prof. Phil Baran, por permitirme realizar una estancia predoctoral en su laboratorio de investigación en el Scripps. Al Dr. Diego Sampedro, de la Universidad de La Rioja, por los estudios fotofísicos realizados. A los Dres. Diego y Manuel Rodríguez Puyol, así como las Dras. Mercedes Giera y Laura Calleros del Grupo de Fisiología del Departamento de Biología de Sistemas de la UAH, por los estudios de inhibición y de

apoptosis. Al Dr. Alberto Domingo por los ensayos de tinción celular. A la Prof.<sup>a</sup> Beatriz de Pascual-Teresa, de la Universidad CEU San Pablo, por los estudios de modelado molecular.

A Eugenia y Desi, los técnicos de laboratorio, Gloria, la secretaria del departamento, y a los técnicos de RMN y E. Masas, el Dr. Antonio Salgado, el Dr. Mijail Galakhov y José M<sup>a</sup> Arribas, por su ayuda en la determinación estructural de algunos compuestos.

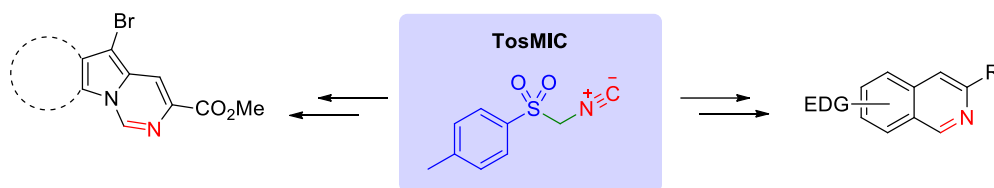
De una forma especial, me gustaría dar las gracias a todos los compañeros de laboratorio con los que he tenido el placer de compartir este camino, y sin los cuales esta experiencia no hubiera sido igual. A Raúl, por estar siempre dispuesto a ayudarme, y por transmitirme tus gustos frikis de juegos de mesa jejej. A Elena Gala, mi compi de congresos. A Idoia y Juan, por ese gran año de Máster y otros tantos momentos. A los compañeros del laboratorio de arriba, Elena Nieto, Patricia, y Gonzalo, así como a Thais, por vuestros consejos y ánimos. A las italianas, Anna y Fabiana, por esa alegría contagiosa. A Sara, Javi G., por la ayuda con el docking, Javi R. y Alberto R., y en especial a aquellos con los que he compartido tantos buenos momentos dentro y fuera del laboratorio: Marisol, mi “minion”, Anita, el gran fichaje, María, mi inorgánica favorita, y mi Albertus y Pedro, “mi gato”, los mejores compañeros que se puede tener: gracias por todos esas charlas, cafés, meriendas, juegos, risas y algún viajecillo, por haberos convertido en grandes amigos, por hacer de cada momento de trabajo un rato divertido y del doctorado una gran experiencia, nunca lo olvidaré.

Finalmente, me gustaría dar las gracias a los pilares de mi vida. Quiero agradecer a mi familia todo el apoyo y cariño que me habéis dado, especialmente mi abuela, mis tíos, mis padres y mi hermano. Óscar, gracias por haber sido ante todo un amigo, y poder contar contigo siempre. A mis padres... tengo tantas cosas que agradecer que podría llenar otro libro. Por escucharme, entenderme, estar ahí, por ayudarme y quererme tanto...Gracias!!!

Y al otro pilar de mi vida, David, mi apoyo y mi equilibrio. Por compartir mis locuras, seguirme al fin del mundo, y ser la persona que más risas y lágrimas ha soportado durante esta tesis... gracias por estar, por ser como eres, por iluminar mi vida.

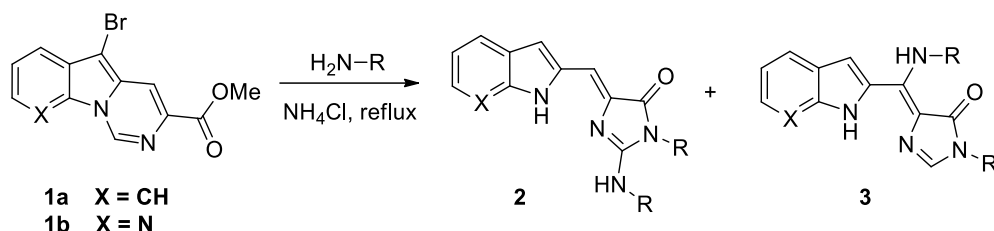
## 1. BACKGROUND

Tosylmethyl isocyanide (TosMIC) is a densely functionalized building block that can engage in a multitude of reactions and has been commonly used in the synthesis of five-membered heterocycles. Our research group has made great progress in the development of new methodologies to expand TosMIC chemistry to the synthesis of six-membered heterocycles by developing a straightforward way to synthesize azolopyrimidines and isoquinolines.



Scheme 1

Some years ago, our group envisaged the synthesis of calpain inhibitors with a peptide attached to an azolopyrimidine system and, in the course of the preparation of these compounds, an unexpected cascade reaction took place between compounds **1** and primary amines, which led to the formation of mixtures of two compounds (**2/3**). These compounds were separated and tested and it was observed that compounds **3** showed calpain inhibitory activity while compounds **2** were inactive but showed fluorescence.



Scheme 2

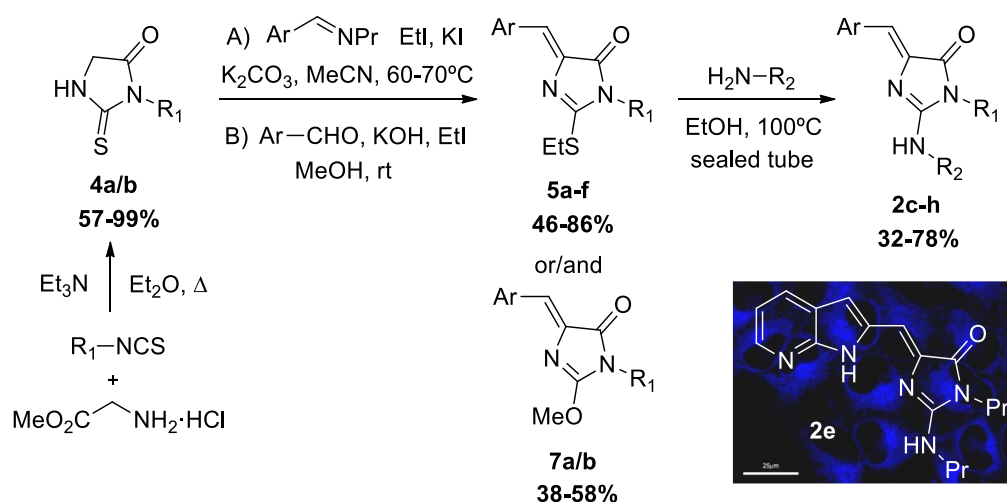
## 2. OBJECTIVES

Given to the potential of the two compounds outlined above, the first goal of this thesis was the development of new methodologies for the synthesis of families of compounds **2** and **3**, in a directed and efficient manner, and the evaluation of their biological/photophysical properties. The second goal was to expand TosMIC chemistry to cover the synthesis of 1,3-disubstituted isoquinolines and  $\gamma$ -carboline through a heterocyclization reaction of TosMIC derivatives and the application of the new methodology to a total synthesis of the alkaloid Cassiarin A.

## 3. RESULTS

### 3.1. GFP-chromophore analogues

A new synthetic route was designed for the preparation of a family of GFP-chromophore analogues. The synthesis of thiohydantoin **4** followed by condensation with the corresponding aldehyde or aldimine led to the formation of intermediates **5** or products **7**. Treatment of **5** with an alkyl amine provided GFP-chromophore analogues **2** in high yields.

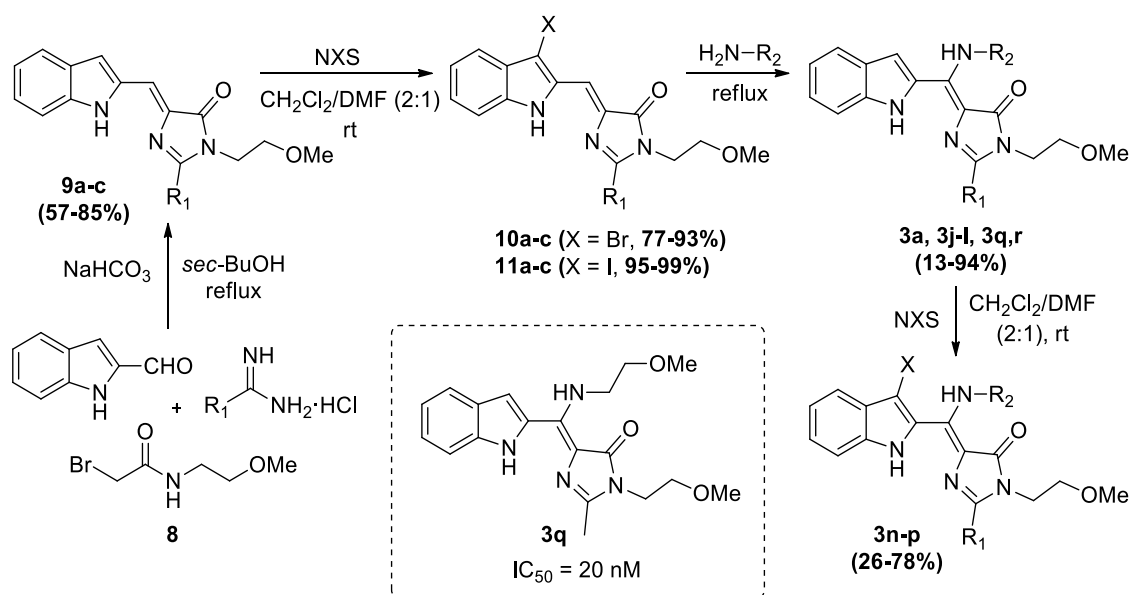


Scheme 3

The results of a photophysical study performed on the products highlighted the remarkable characteristics of some analogues. For example, compound **2c** exhibits significantly enhanced fluorescence properties: its quantum yield is two orders of magnitude higher than its parent *p*-HBDI. Compound **2e** has  $\Phi_F = 44.9\%$  in chloroform and has very promising properties as a cell-permeant, live-cell fluorescent stain.

### 3.2. Calpain inhibitors

A new methodology was developed for the synthesis of a family of non-peptidic calpain inhibitors. The methodology involves a multicomponent reaction, subsequent halogenation and an aza-Michael reaction for the introduction of the exocyclic amine. A final halogenation step provided three indolo-substituted compounds.



Scheme 4

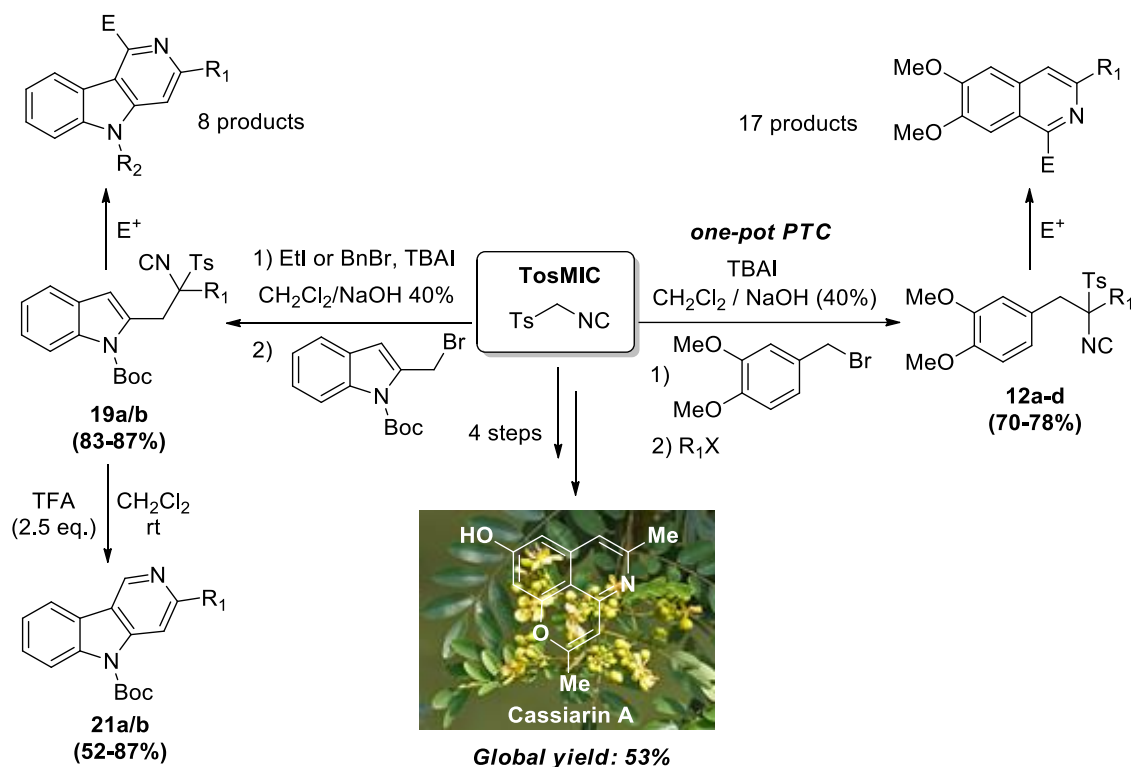
This synthetic route allowed the straightforward preparation of a family of nine compounds that have been tested as calpain inhibitors. The compounds with the highest inhibition are **3j**, with a slight enhancement of inhibition in comparison with the hit **3a** ( $\text{IC}_{50}$  (**3a**) =  $0.46 \mu\text{M}$ ; (**3j**) =  $0.35 \mu\text{M}$ ), and compound **3q**, with a significant increase in inhibitory activity ( $\text{IC}_{50} = 0.02 \mu\text{M}$ ). Compound **3a** inhibits calpain by an uncompetitive

## SUMMARY

mechanism and it was capable of blocking *chemical ischemia* induction of apoptosis in intact human kidney tubular epithelial cells by preventing sodium azide-dependent calpain activation.

### 3.3. Heterocyclizations with TosMIC

A new methodology was developed for the synthesis of 1,3-disubstituted isoquinolines and  $\gamma$ -carboline. The TosMIC derivatives required for the cyclization step were prepared under phase transfer catalysis (PTC) conditions by the sequential reaction of TosMIC with two alkyl halides. These isocyanides were subjected to a heterocyclization reaction with acids or electrophiles. This method is based on previous research in our group and takes advantage of the ability of isocyanides to act both as nucleophiles and electrophiles on the same carbon.



Scheme 5

The reaction works efficiently when electron-donating substituents are present in the benzene ring in the case of isoquinolines. For the preparation of  $\gamma$ -carbolines the indole is sufficiently electron-rich to achieve the cyclization. This methodology allowed the preparation of 17 isoquinoline and 10  $\gamma$ -carboline derivatives and it has also been successfully applied to a total synthesis of the alkaloid Cassiarin A.

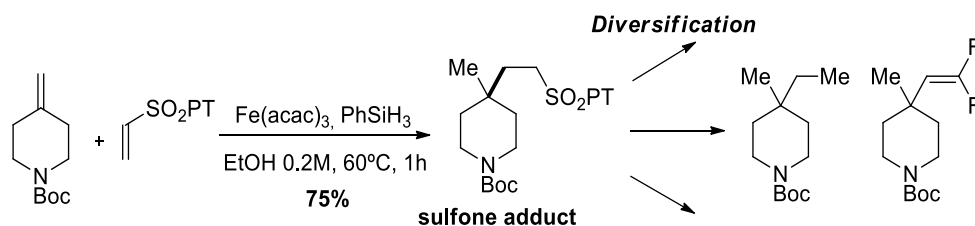
#### 4. CONCLUSIONS

A new methodology has been developed for the synthesis of a series of GFP-chromophore analogues, some of which present enhanced fluorescence and cell-staining properties.

A new and efficient route for the preparation of a family of non-peptidic calpain inhibitors has been developed. The biological data indicate that compound **3q** has the highest inhibitory activity of the series ( $IC_{50} = 20$  nM), and the hit **3a** exhibited anti-apoptotic properties.

A new methodology is described for the synthesis of 1,3-disubstituted isoquinolines and  $\gamma$ -carbolines through a heterocyclization of TosMIC derivatives. The methodology has been applied to a total synthesis of Cassiarin A.

An **Annex** with the results obtained during my predoctoral stay in Phil Baran's research group at The Scripps Research Institute in San Diego (USA) is also included at the end of this memory. The work performed was focused on the diversification of a sulfone adduct formed by an iron-catalyzed olefin cross-coupling. The diversification conducted to a wide range of products, among which the hydroethylated and the difluorovinylated products can be highlighted.



Scheme 6

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b><sup>13</sup>C-RMN</b>	Resonancia magnética nuclear de carbono ( <i>Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy</i> )
<b><sup>1</sup>H-RMN</b>	Resonancia magnética nuclear de protón ( <i>Carbon nuclear magnetic resonance spectroscopy</i> )
<b>Φ<sub>F</sub></b>	Rendimiento cuántico de fluorescencia ( <i>Quantum yield</i> )
<b>°C</b>	Grado centígrado ( <i>Degree Centigrade</i> )
<b>Å</b>	Angström
<b>Ac</b>	Acilo ( <i>AcyI</i> )
<b>AD</b>	Enfermedad de Alzheimer ( <i>Alzheimer Disease</i> )
<b>AIBN</b>	Azobisisobutironitrilo ( <i>Azobisisobutyronitrile</i> )
<b>AMC</b>	7-Amino-4-metilcumarina ( <i>7-Amino-4-methylcoumarin</i> )
<b>APP</b>	Proteína precursora amiloide ( <i>Amiloid Precursor Protein</i> )
<b>Ar</b>	Arilo ( <i>Aryl</i> )
<b>Ar</b>	Argón ( <i>Argon</i> )
<b>Asn</b>	Asparagina ( <i>Asparagine</i> )
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato ( <i>Adenosine triphosphate</i> )
<b>B</b>	Base
<b>B</b>	Boro ( <i>Boron</i> )
<b>Bn</b>	Bencilo ( <i>Benzyl</i> )
<b>Boc</b>	<i>tert</i> -butoxicarbonilo ( <i>tert-butoxycarbonyl</i> )
<b>br</b>	Señal ancha ( <i>Broad</i> )
<b>Bu</b>	Butilo ( <i>Butyl</i> )
<b>Calcd.</b>	Calculado ( <i>Calculated</i> )
<b>CAPN</b>	Calpaína ( <i>Calpain</i> )
<b>CAPNS</b>	Subunidad reguladora de las calpaínas 1 y 2. ( <i>Calpain regulating subunit</i> )
<b>Cat.</b>	Catalítico / Catalizador ( <i>Catalytic / catalyst</i> )
<b>CBSW</b>	<i>Calpain-type beta-sandwich domain</i>
<b>Cbz</b>	Benciloxicarbonilo ( <i>Benzyloxycarbonyl</i> )
<b>CDK5</b>	<i>Cyclin-dependent kinase 5</i>
<b>CoA</b>	Coenzima A ( <i>Coenzyme A</i> )
<b>col.</b>	Colaboradores ( <i>Coworkers</i> )
<b>Conv.</b>	Conversión ( <i>Conversion</i> )
<b>COSY</b>	<i>Correlation Spectroscopy</i>



<b>CT</b>	Medio de cultivo control ( <i>Control culture medium</i> )
<b>Cys</b>	Cisteína ( <i>Cysteine</i> )
<b>CysPc</b>	Dominio proteolítico de cisteín proteasas ( <i>Proteolytic domain of cysteine proteases</i> )
<b>d</b>	Deuterado ( <i>Deuterated</i> )
<b>d</b>	Doblete ( <i>Doublet</i> )
<b>δ</b>	Desplazamiento químico, en ppm ( <i>Chemical shift, ppm</i> )
<b>Δ</b>	Calentamiento a reflujo ( <i>Reflux</i> )
<b>dba</b>	Dibencilidenacetona ( <i>Dibenzylideneacetone</i> )
<b>DCE</b>	Dicloroetano ( <i>Dichloroethane</i> )
<b>DDQ</b>	2,3-Dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinone
<b>decomp.</b>	Descomposición / descompone ( <i>Decomposition / decomposes</i> )
<b>DIBAL-H</b>	Hidruro de diisobutilaluminio ( <i>Diisobutylaluminum hydride</i> )
<b>DIPEA</b>	N,N-Diisopropiletilamina ( <i>N,N-Diisopropylethylamine</i> )
<b>DMAP</b>	4-(Dimetilamino)piridina ( <i>4-(Dimethylamino)pyridine</i> )
<b>DME</b>	Dimetoxietano ( <i>Dimethoxyethane</i> )
<b>DMF</b>	Dimetilformamida ( <i>Dimethylformamide</i> )
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido ( <i>Dimethylsulfoxide</i> )
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico ( <i>Desoxyribonucleic acid</i> )
<b>DtBPF</b>	(di- <i>tert</i> -butilfosfino)ferroceno ( <i>((di-tert-butylphosphino)ferrocene</i> )
<b>E<sup>+</sup></b>	Electrófilo ( <i>Electrophile</i> )
<b>EDG</b>	Grupo electrodonador ( <i>Electron-donating group</i> )
<b>e.g.</b>	<i>exempli gratia</i> (latín); por ejemplo ( <i>for example</i> )
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico ( <i>Epidermal growth factor</i> )
<b>Eq. / Equiv.</b>	Equivalentes ( <i>Equivalents</i> )
<b>ERC</b>	Enfermedad renal crónica ( <i>Chronic kidney disease</i> )
<b>ERK</b>	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
<b>ESI</b>	Ionización por electrospray ( <i>Electrospray Ionization</i> )
<b>ESIPT</b>	<i>Excited state intramolecular proton transfer</i>
<b>Et</b>	Etilo ( <i>Ethyl</i> )
<b>et al.</b>	<i>et alii</i> (latín); Y otros / y colaboradores ( <i>And coworkers</i> )
<b>EWG</b>	Grupo electroatractor ( <i>Electron-withdrawing group</i> )
<b>f</b>	Fuerza del oscilador ( <i>Oscillator strength</i> )
<b>FAK</b>	Kinasa de adhesión focal ( <i>Focal adhesion kinase</i> )

## GLOSARIO DE ABBREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>FPs</b>	Proteínas fluorescentes ( <i>Fluorescent proteins</i> )
<b>FRET</b>	Transferencia de energía por resonancia tipo Förster ( <i>Förster Resonance Energy Transfer</i> )
<b>g</b>	Gramos ( <i>Grams</i> )
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente ( <i>Green fluorescent protein</i> )
<b>Gln</b>	Glutamina ( <i>Glutamine</i> )
<b>Glu</b>	Ácido glutámico ( <i>Glutamic acid</i> )
<b>Gly</b>	Glicina ( <i>Glycine</i> )
<b>GR</b>	<i>Glycine-rich domain</i>
<b>h</b>	Horas ( <i>Hours</i> )
<b>HAT</b>	<i>Hydrogen atom transfer</i>
<b>HBDI</b>	Hidroxibencilidenimidazolona ( <i>hydroxybenzylideneimidazolinone</i> )
<b>HDL</b>	<i>High-density lipoprotein</i>
<b>His</b>	Histidina ( <i>Histidine</i> )
<b>hit</b>	Cabeza de serie
<b>HMBC</b>	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
<b>HOMO</b>	<i>Highest occupied molecular orbital</i>
<b>HRMS</b>	Espectrometría de masas de alta resolución ( <i>High resolution mass spectrometry</i> )
<b>HSA</b>	Albumina de suero humana ( <i>Human Serum Albumin</i> )
<b>HSQC</b>	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>
<b>HTT</b>	<i>Huntington protein</i>
<b>Hz</b>	Hercio ( <i>Hertz</i> )
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria máxima media ( <i>Half maximal inhibitory concentration</i> )
<b>Ile</b>	Isoleucina ( <i>Isoleucine</i> )
<b>IMCR</b>	<i>Isocyanide-based multicomponent reaction</i>
<b>IR</b>	Infrarrojo ( <i>Infrared</i> )
<b>IS</b>	Secuencia de inserción ( <i>Insertion sequence</i> )
<b>IVC</b>	Isovalerocarnitina ( <i>Isovalerocarnitine</i> )
<b>J</b>	Constante de acoplamiento, en Hz ( <i>Coupling constant in Hertz</i> )
<b>kDa</b>	KiloDalton
<b>KHDMS</b>	Bis(trimetilsilil)amiduro de potasio ( <i>Potassium bis(trimethylsilyl)amide</i> )

<b>K<sub>i</sub></b>	Constante de disociación del complejo enzima-inhibidor ( <i>Inhibitor constant</i> )
<b>λ</b>	Longitud de onda ( <i>Wavelength</i> )
<b>λ<sub>abs</sub></b>	Longitud de onda máxima de absorción ( <i>Absorption maxima</i> )
<b>λ<sub>em</sub></b>	Longitud de onda máxima de emisión ( <i>Emission maxima</i> )
<b>λ<sub>exc</sub></b>	Longitud de onda de excitación ( <i>Excitation wavelength</i> )
<b>LDA</b>	Diisopropilamiduro de litio ( <i>Lithium diisopropylamide</i> )
<b>Leu</b>	Leucina ( <i>Leucine</i> )
<b>LGMD2A</b>	Distrofia muscular <i>limb-girdle</i> tipo 2A ( <i>Limb-girdle muscular dystrophy type 2A</i> )
<b>LiHMDS</b>	Bis(trimetilsilil)amiduro de litio ( <i>Lithium bis(trimethylsilyl)amide</i> )
<b>Lit.</b>	Literatura ( <i>Literature</i> )
<b>LUMO</b>	<i>Lowest unoccupied molecular orbital</i>
<b>Lys</b>	Lisina ( <i>Lysine</i> )
<b>μM</b>	Micromolar
<b>m-</b>	Sustituyente en posición meta ( <i>meta substituent</i> )
<b>m</b>	Multiplete ( <i>Multiplet</i> )
<b>M</b>	Molaridad ( <i>Molarity</i> )
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
<b>MD</b>	Dinámica molecular ( <i>Molecular dynamics</i> )
<b>Me</b>	Metilo ( <i>Methyl</i> )
<b>Met</b>	Metionina ( <i>Methionine</i> )
<b>mg</b>	Miligramos ( <i>Milligrams</i> )
<b>MHz</b>	Megahercios ( <i>Megahertz</i> )
<b>min</b>	Minutos ( <i>Minutes</i> )
<b>MIT</b>	<i>Microtubule interaction and transport motif</i>
<b>mL</b>	Mililitros ( <i>Millilitre</i> )
<b>mM</b>	Milimolar ( <i>Millimolar</i> )
<b>mmol</b>	Milimoles ( <i>Millimole</i> )
<b>MOM</b>	Metoximetiléter ( <i>Methoxymethyl ether</i> )
<b>Mp.</b>	Punto de fusión ( <i>Melting point</i> )
<b>MS</b>	Espectrometría de masas ( <i>Mass spectrometry</i> )
<b>MTT</b>	<i>3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
<b>MW</b>	Microondas ( <i>Microwave</i> )

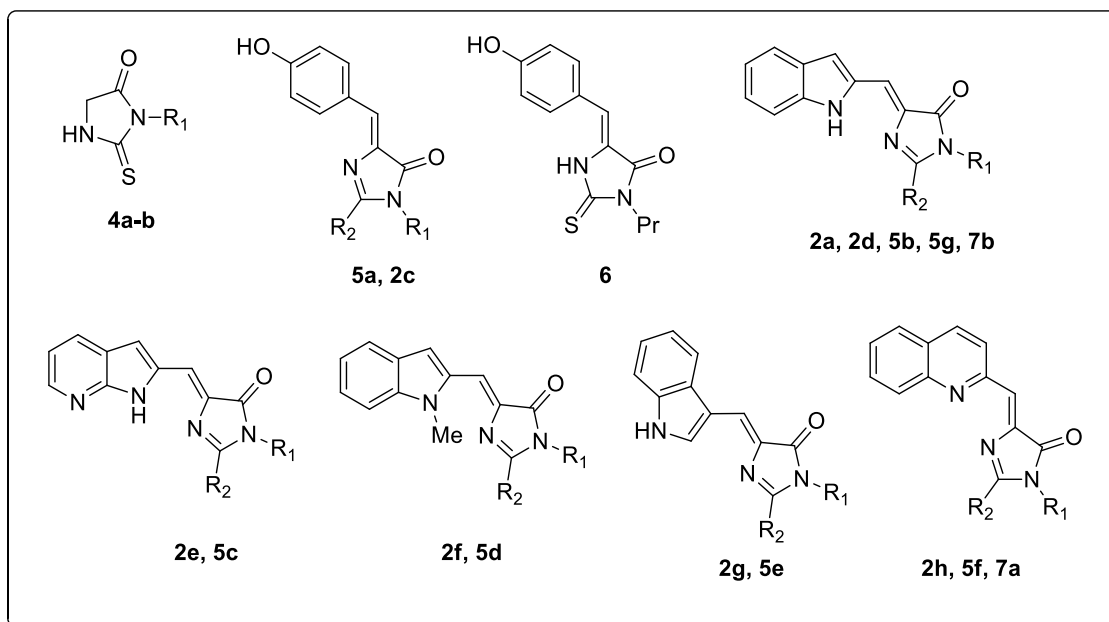
## GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>m/z</b>	Relación masa/carga ( <i>Mass-to-charge ratio</i> )
<b>nbd</b>	Norbornadieno ( <i>Norbornadiene</i> )
<b>NBS</b>	<i>N</i> -bromosuccinimida ( <i>N-bromosuccinimide</i> )
<b>NCS</b>	<i>N</i> -clorosuccinimida ( <i>N-chlorosuccinimide</i> )
<b>NIS</b>	<i>N</i> -iodosuccinimida ( <i>N-iodosuccinimide</i> )
<b>nm</b>	Nanómetro ( <i>Nanometer</i> )
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>NOE</b>	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
<b>NT</b>	<i>Nuclear translocation domain</i>
<b>NXS</b>	<i>N</i> -halosuccinimida ( <i>N-halosuccinimide</i> )
<b><i>o</i>-</b>	Sustituyente en posición <i>orto</i> ( <i>orto substituent</i> )
<b>OLED</b>	<i>Organic light-emitting diode</i>
<b><math>\pi^*</math></b>	$\pi$ antienlazante
<b><i>p</i>-</b>	Sustituyente en posición <i>para</i> ( <i>para substituent</i> )
<b>PBH</b>	PaI B-homólogo
<b>PC</b>	<i>Protease-core</i>
<b>PCM</b>	Modelo continuo polarizable ( <i>Polarizable continuum model</i> )
<b>PDB</b>	<i>Protein Data Bank</i>
<b>P.e.</b>	Por ejemplo ( <i>for example</i> )
<b>PEF</b>	<i>Penta-EF-hand</i>
<b>Ph</b>	Fenilo ( <i>Phenyl</i> )
<b>PKA</b>	Proteína kinasa A ( <i>Protein kinase A</i> )
<b>PPA</b>	Ácido polifosfórico ( <i>Poliphosphoric acid</i> )
<b>ppm</b>	Partes por millón ( <i>Parts-per-million</i> )
<b>Pr</b>	Propilo ( <i>Propyl</i> )
<b>PT</b>	<i>N</i> -fenil tetrazol ( <i>N-phenyl tetrazole</i> )
<b>PTC</b>	Catálisis de transferencia de fase ( <i>Phase transfer catalysis</i> )
<b>q</b>	Cuadruplete ( <i>Quartet</i> )
<b>R</b>	Sustituyente ( <i>Substituent</i> )
<b>Rdto.</b>	Rendimiento ( <i>Yield</i> )
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico ( <i>Endoplasmic reticulum</i> )
<b>REDINREN</b>	Red de Investigación Renal ( <i>Kidney Research Network</i> )
<b>R<sub>f</sub></b>	Factor de retención ( <i>Retention factor</i> )
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico ( <i>Ribonucleic acid</i> )

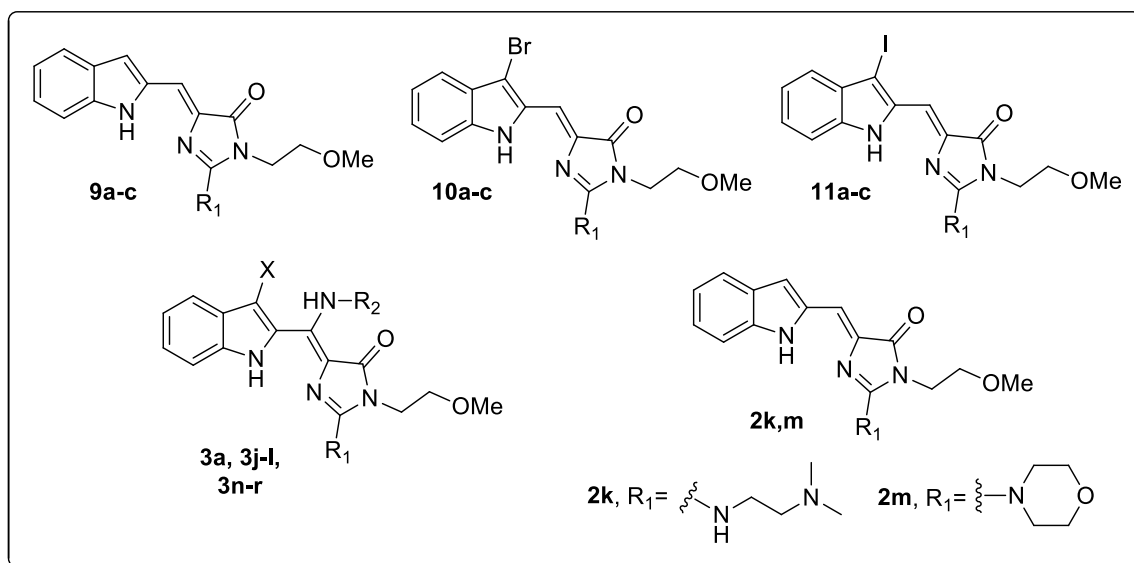
<b>RPT</b>	Túbulo proximal renal ( <i>Renal Proximal Tubule</i> )
<b>rt</b>	Temperatura ambiente ( <i>Room temperature</i> )
<b>s</b>	Singlete ( <i>Singlet</i> )
<b>SAR</b>	Estudio de relación estructura-actividad ( <i>Structure-activity relationship</i> )
<b>Sat.</b>	Saturado ( <i>Saturated</i> )
<b>SEM</b>	Error estándar de la media ( <i>Standard error of the mean</i> )
<b>Ser</b>	Serina ( <i>Serine</i> )
<b>SOH</b>	<i>Sol-homology domain</i>
<b>SOL H</b>	<i>Small optic lobe homology</i>
<b>Suc</b>	Ácido succinámico ( <i>Succinamic acid</i> )
<b>t</b>	<i>tert</i>
<b>t</b>	Triplete ( <i>Triplet</i> )
<b>t</b>	Tiempo ( <i>Time</i> )
<b>T / Temp.</b>	Temperatura ( <i>Temperature</i> )
<b>t. a.</b>	Temperatura ambiente ( <i>Room temperature</i> )
<b>TBAI</b>	Ioduro de tetrabutilamonio ( <i>Tetrabutylammonium iodide</i> )
<b>TBDMS</b>	<i>tert</i> -Butildimetilsililo ( <i>tert-Butyldimethylsilyl</i> )
<b>TD-DFT</b>	<i>Time Dependent-Density Functional Theory</i>
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético ( <i>Trifluoroacetic acid</i> )
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano ( <i>Tetrahydrofuran</i> )
<b>Thr</b>	Treonina ( <i>Threonine</i> )
<b>TosMIC</b>	Tosilmetilisonitrilo ( <i>Toluenesulfonylmethyl isocyanide</i> )
<b>Trp</b>	Triptófano ( <i>Tryptophan</i> )
<b>Ts</b>	Tosilo ( <i>Tosyl</i> )
<b>TTMSS</b>	Tris(trimetilsilil)silano ( <i>Tris(trimethylsilyl)silane</i> )
<b>Tyr</b>	Tirosina ( <i>Tyrosine</i> )
<b>UV</b>	Ultravioleta ( <i>Ultraviolet</i> )
<b>X</b>	Halógeno / haluro ( <i>Halogen / halide</i> )
<b>XP</b>	Extra precisión ( <i>Extra precision</i> )



**Capítulo 2 – Análogos del cromóforo de la GFP (*Chapter 2 – GFP-chromophore analogues*)**



Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>4a</b>	Pr	-
<b>4b</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OMe	-
<b>2a</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OMe	HN(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OMe
<b>2c-h</b>	Pr	HNPr
<b>5a-f</b>	Pr	SEt
<b>5g</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OMe	SEt
<b>7a</b>	Pr	OMe
<b>7b</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OMe	OMe

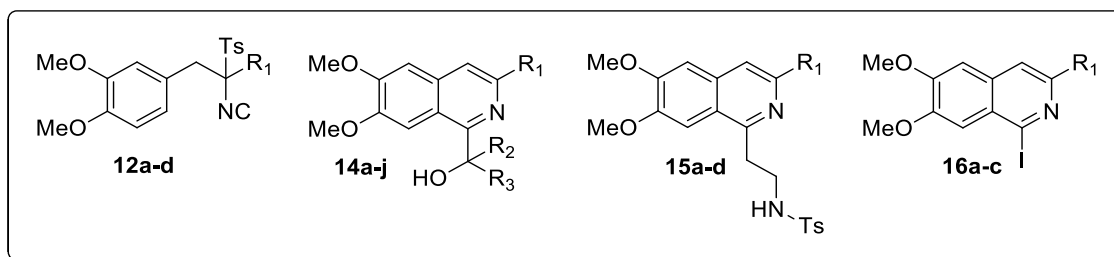
Capítulo 3 – Inhibidores de calpaínas (*Chapter 3 – Calpain inhibitors*)

Compuesto	R <sub>1</sub>	Compuesto	X	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
9-11a	H	3a	H	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OMe
9-11b	Me	3j	H	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>
9-11c	Ph	3k	H	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NMe <sub>2</sub>
		3l	H	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OMe
		3n	Br	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OMe
		3o	I	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OMe
		3p	Cl	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OMe
		3q	H	Me	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OMe
		3r	H	Ph	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OMe



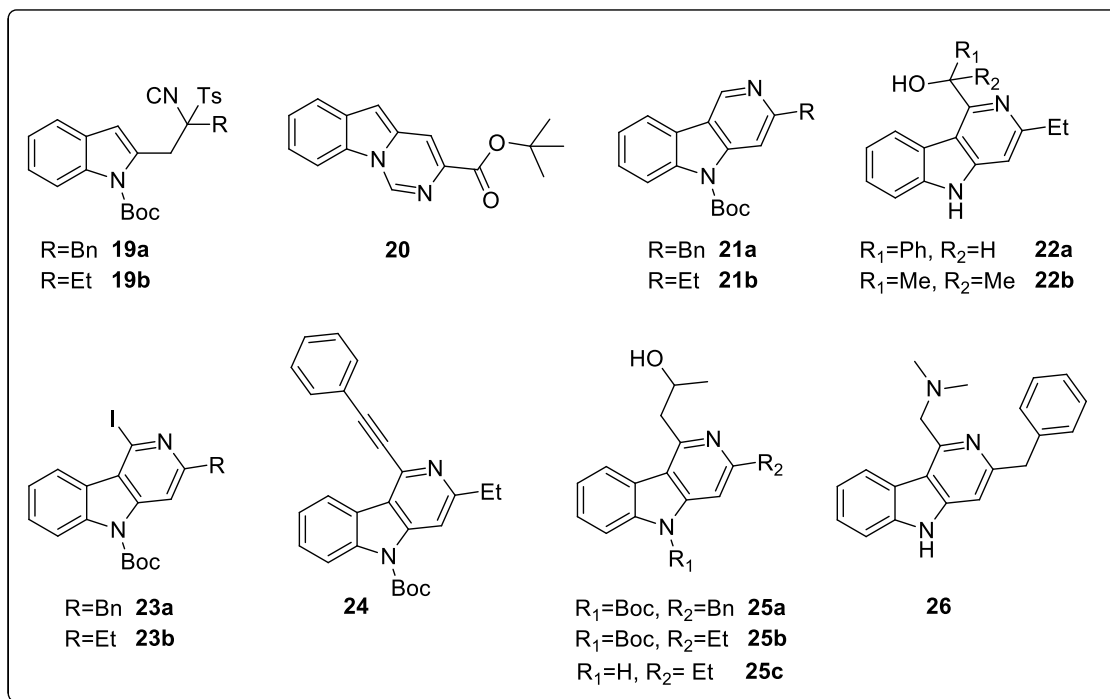
# Capítulo 4 – Heterociclaciones con TosMIC (*Chapter 4 – TosMIC heterocyclizations*)

## Parte I. Isoquinolinas (*Part I. Isoquinolines*)

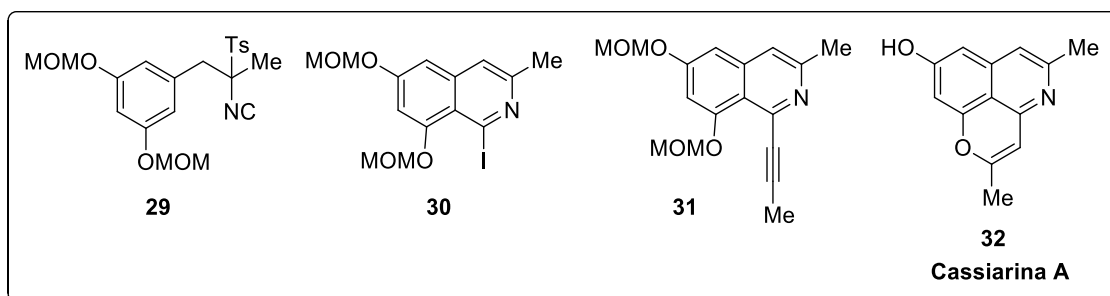


Compuestos 12 y 15	R <sub>1</sub>	Compuestos 16	R <sub>1</sub>	Compuestos 14	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>a</b>	Bn	<b>a</b>	Bn	<b>a</b>	Bn	H	Ph
<b>b</b>	Et	<b>b</b>	Et	<b>b</b>	Et	H	Ph
<b>c</b>	Alilo	<b>c</b>	Me	<b>c</b>	Alilo	H	Ph
<b>d</b>	Me			<b>d</b>	Me	H	Ph
				<b>e</b>	Bn	H	Et
				<b>f</b>	Et	H	Et
				<b>g</b>	Bn	Me	Ph
				<b>h</b>	Bn	Me	Me
				<b>i</b>	Bn	Ph	Ph
				<b>j</b>	Me	Ph	Ph

**Parte II.  $\gamma$ -Carbolinas (*Part II.  $\gamma$ -Carbolines*)**



**Parte III. Cassiarina A (*Part III. Cassiarin A*)**



# ÍNDICE

<b>1. Introducción general y objetivos .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Síntesis de una serie de análogos del cromóforo de la proteína verde fluorescente .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. ANTECEDENTES.....</b>	<b>17</b>
2.1.1. La proteína verde fluorescente (GFP).....	17
2.1.2. El cromóforo de la GFP .....	26
<b>2.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
2.2.1. Introducción .....	41
2.2.2. Síntesis de los cromóforos .....	42
2.2.3. Estudio fotofísico .....	50
2.2.4. Estudios de Resonancia Magnética Nuclear .....	60
2.2.5. Estudios de tinción celular .....	65
<b>3. Síntesis de una familia de inhibidores de calpaínas.....</b>	<b>69</b>
<b>3.1. ANTECEDENTES.....</b>	<b>71</b>
3.1.1. Introducción .....	71
3.1.2. Calpaínas.....	72
3.1.3. Inhibidores de calpaínas.....	86
<b>3.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>106</b>
3.2.1. Diseño de una ruta sintética alternativa para los compuestos <b>3</b> .....	106
3.2.2. Síntesis de análogos de <b>3a</b> .....	113
3.2.3. Ensayos de inhibición de calpaína .....	118
<b>4. Heterociclaciones con TosMIC. Síntesis de isoquinolinas 1,3-disustituidas, <math>\gamma</math>-carbolinas y Cassiarina A .....</b>	<b>131</b>
<b>4.1. ANTECEDENTES GENERALES .....</b>	<b>133</b>
4.1.1. Isonitrilos .....	133

<b>4.2. PARTE I. HETEROCICLACIÓN DE DERIVADOS DE <math>\alpha</math>-BENCIL TOSMIC CON ELECTRÓFILOS: SÍNTESIS DE ISOQUINOLINAS</b>	140
4.2.1. Antecedentes.....	140
4.2.2. Discusión de resultados .....	152
<b>4.3. PARTE II. HETEROCICLACIÓN DE DERIVADOS DE <math>\alpha</math>-METILINDOLIL TOSMIC CON ÁCIDOS Y ELECTRÓFILOS: SÍNTESIS DE <math>\gamma</math>-CARBOLINAS</b>	160
4.3.1. Antecedentes.....	160
4.3.2. Discusión de resultados .....	175
<b>4.4. PARTE III. SÍNTESIS TOTAL DE CASSIARINA A</b>	184
4.4.1. Cassiarina A.....	184
4.4.2. Síntesis totales de Cassiarina A.....	185
4.4.3. Síntesis total de Cassiarina A .....	187
<b>5. Experimental procedures</b>	191
General Information .....	193
<b>Experimental details and characterization data for compounds of Chapter 2.</b>	
<b>GFP-chromophore analogues</b> .....	194
General procedure for the preparation of thiohydantoins <b>4a</b> and <b>4b</b> .....	194
General procedure for the preparation of imidazolones <b>5a-d</b> , <b>5g</b> (Method A) .....	195
General procedure for the preparation of imidazolones <b>5e</b> , <b>5f</b> , <b>7b</b> (Method B)....	200
General procedure for the preparation of GFP-chromophore analogues <b>2a</b> , <b>2c-2h</b> .....	203
<b>Experimental details and characterization data for compounds of Chapter 3.</b>	
<b>Calpain inhibitors</b> .....	209
General procedure for the preparation of compounds <b>9a-c</b> .....	209
General procedure for the preparation of halogenated compounds <b>10a-c</b> and <b>11a-c</b> .....	212
General procedure for the preparation of amino derivatives <b>3a</b> , <b>3j-l</b> , <b>3q/r</b> .....	217
General procedure for the preparation of halogenated compounds <b>3n-p</b> .....	223

<b>Experimental details and characterization data for compounds of Chapter 4..</b>	<b>226</b>
<b>Part I. Isoquinolines .....</b>	<b>226</b>
General procedure for the preparation of $\alpha$ -benzyl TosMIC derivatives <b>12a-d</b> ....	226
General procedure for the preparation of compounds <b>14a-j</b> .....	229
General procedure for the preparation of compounds <b>15a-d</b> .....	235
General procedure for the preparation of compounds <b>16a-c</b> .....	239
<b>Part II. <math>\gamma</math>-Carbolines .....</b>	<b>241</b>
General procedure for the preparation of $\alpha$ -(2-indolylmethyl) TosMIC derivatives <b>19a/b</b> .....	241
General procedure for the preparation of $\gamma$ -carbolines <b>21a/b</b> .....	244
Preparation of $\gamma$ -carbolines <b>22a/b, 23a/b, 24, 25a-c</b> and <b>26</b> .....	245
<b>Part III. Cassiarin A .....</b>	<b>253</b>
<b>6. Conclusions .....</b>	<b>257</b>
<b>7. Annex: work performed at The Scripps Research Institute .....</b>	<b>263</b>
<b>7.1. Introduction .....</b>	<b>265</b>
<b>7.2. Group background .....</b>	<b>266</b>
Iron-catalyzed hydroalkylation of unactivated olefins.....	267
Mechanism of the reaction.....	271
<b>7.3. Discussion: Diversification of a lead compound to generate additional molecular complexity.....</b>	<b>273</b>
<b>7.4. Experimental procedures .....</b>	<b>276</b>
<b>7.5. Conclusions.....</b>	<b>284</b>



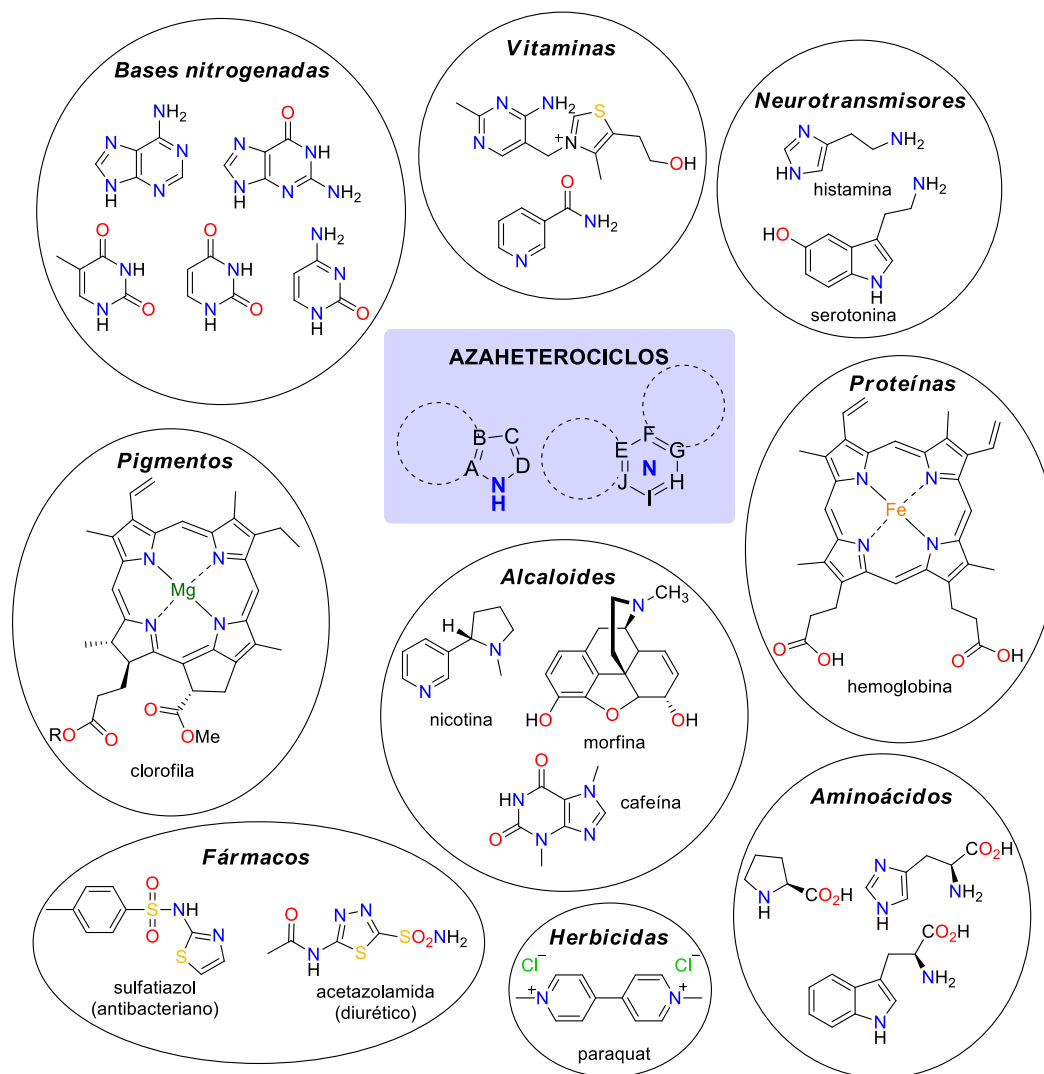
# **1. Introducción general y objetivos**







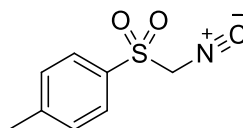
Los heterociclos son un grupo de compuestos orgánicos ampliamente distribuidos en la naturaleza que resultan de vital importancia debido a su papel en el metabolismo celular. En particular, los azaheterociclos se encuentran presentes en moléculas de gran relevancia para la vida, como son las bases púricas y pirimidínicas de los ácidos nucleicos, distintas vitaminas, neurotransmisores, aminoácidos, proteínas y pigmentos.



**Figura 1.1.** Compuestos con azaheterociclos en su estructura.

De igual modo, las estructuras de diversos fármacos y herbicidas presentes en el mercado así como de numerosos productos naturales con actividad biológica, como los alcaloides nicotina, cafeína y morfina, contienen azaheterociclos (**Figura 1.1**). Por todo ello, el diseño de nuevos métodos de síntesis de este tipo de compuestos sigue presentando gran interés.

A finales de los años 90, nuestro grupo de investigación se planteó como objetivo la exploración de la reactividad del tosilmetilisonitrilo (**Figura 1.2**), comúnmente conocido como TosMIC, con la intención de sintetizar heterociclos nitrogenados de seis miembros, expandiendo de este modo la química de este compuesto utilizado hasta esa fecha principalmente en la formación de heterociclos de cinco eslabones.<sup>1,2</sup>



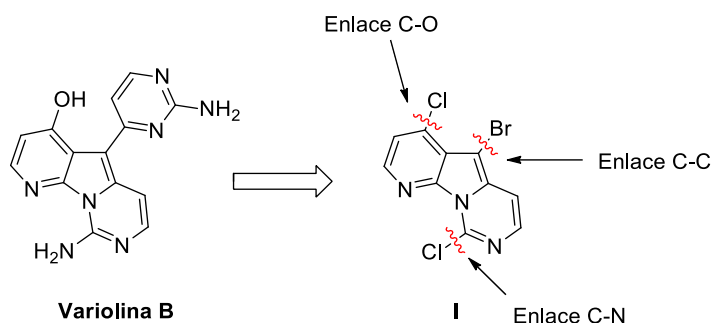
**Figura 1.2.** Estructura del tosilmetilisonitrilo (TosMIC).

La metodología desarrollada se aplicaría en un proyecto encaminado a la síntesis total de la Variolina B, cuya estructura se muestra en la **Figura 1.3**. La ruta sintética propuesta para la obtención de este alcaloide tiene como intermedio clave el compuesto **I**, preparado a partir de TosMIC, y permite la funcionalización de la molécula a través de acoplamientos selectivos C–O, C–C y C–N catalizados por paladio en distintas posiciones.

---

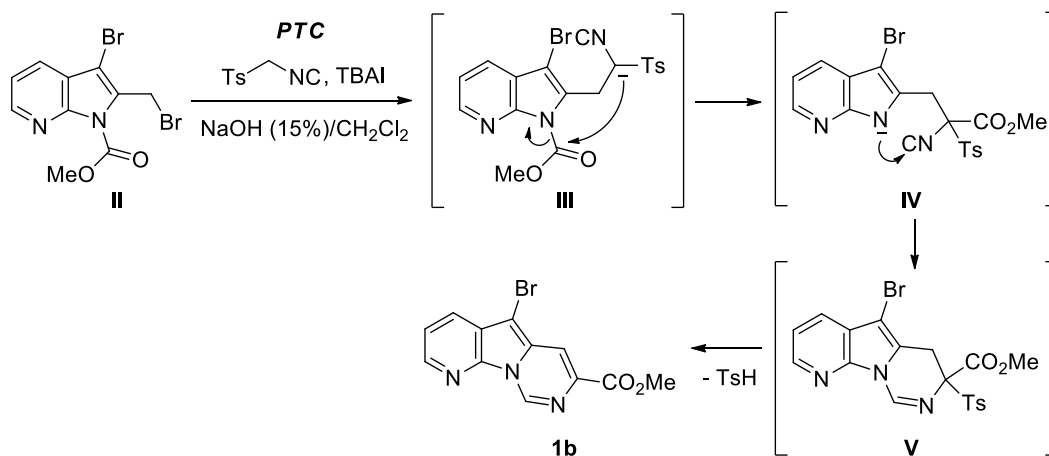
<sup>1</sup> (a) Lygin, V. A.; Meijere, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 9094 – 9124. (b) Sadjadi, S.; Heravi, M. *Tetrahedron*, **2011**, 67, 2707 – 2752.

<sup>2</sup> Ono, N.; Okujima, T. *Synthesis of Pyrroles and Their Derivatives from Isocyanides in Isocyanide Chemistry Applications in Synthesis and Material Science* **2012**, 385 – 429.



**Figura 1.3.** Estructura de la Variolina B e intermedio propuesto para su síntesis.

La metodología desarrollada para la obtención del intermedio **I** se optimizó utilizando para ello modelos más sencillos. Uno de los primeros fue la reacción en condiciones de transferencia de fase (PTC) entre TosMIC y el derivado de azaindol **II**, que condujo a la obtención del 5-bromopirido[3',2':4,5]pirrolo[1,2-c]pirimidin-7-carboxilato de metilo **1b**. El mecanismo propuesto para este proceso en cascada se muestra en el **Esquema 1.1** e implica una sustitución nucleófila del anión generado por el TosMIC en medio básico sobre el bromometilpirrol seguida de una transposición intramolecular del grupo protector metoxycarbonilo. A continuación, tendría lugar el ataque nucleófilo del nitrógeno del anillo de pirrol sobre el carbono terminal del grupo isonitrilo, produciéndose la ciclación y la posterior eliminación del ácido *p*-toluensulfónico.



**Esquema 1.1.** Mecanismo propuesto para la formación de la piridopirrolpirimidina **1b**.

Parecida reactividad tiene lugar cuando el azaindol de partida se sustituye por un indol, obteniéndose en este caso una serie de compuestos con estructura de imidazo[1,2-*c*]pirimidina.<sup>3</sup> Asimismo, también son accesibles aplicando esta misma estrategia sintética diversos núcleos bicíclicos y tricíclicos tales como pirimido[1,6-*a*]indoles, benzo[4,5]imidazo[1,2-*c*]pirimidinas, imidazo[1,2-*c*]pirimidinas y pirazolo[1,5-*c*]pirimidinas.<sup>4</sup>

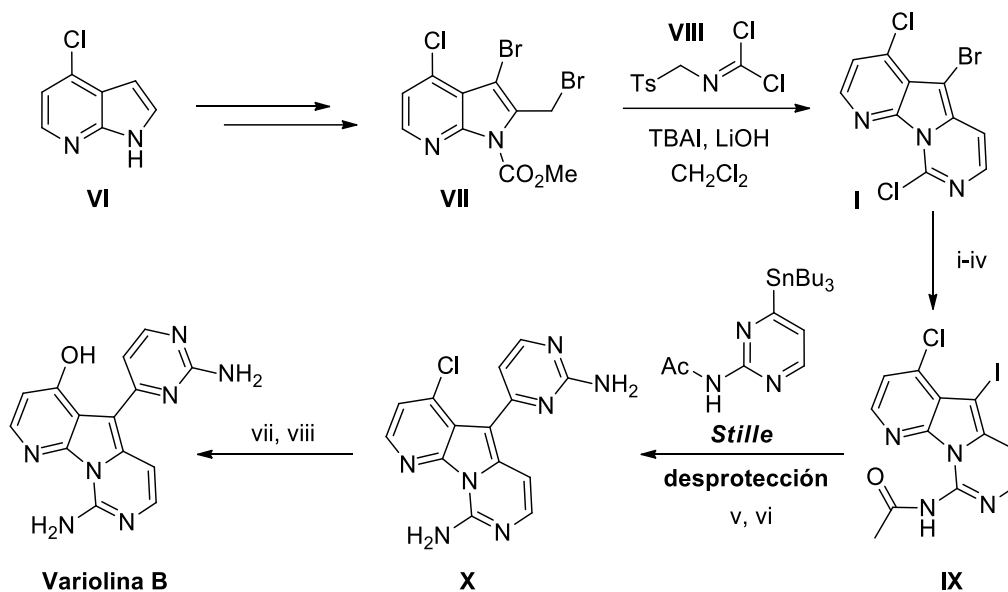
Una modificación de esta metodología fue aplicada con éxito en la síntesis total de la Variolina B (**Esquema 1.2**). En ella, partiendo del derivado de azaindol **VI** y utilizando el derivado diclorado de TosMIC **VIII**, se obtuvo el intermedio **I** sobre el que se realizaron secuencialmente acoplamientos de Pd C–N sobre el C2 pirimidínico, C–C sobre el C3 pirrólico (reacción de Stille) y C–O sobre el C3 piridínico, acompañados de las correspondientes protecciones y desprotecciones, para dar lugar al alcaloide deseado.<sup>5</sup>

---

<sup>3</sup> Mendiola, J.; Minguez, J. M.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Org. Lett.* **2000**, 2, 3253 – 3256.

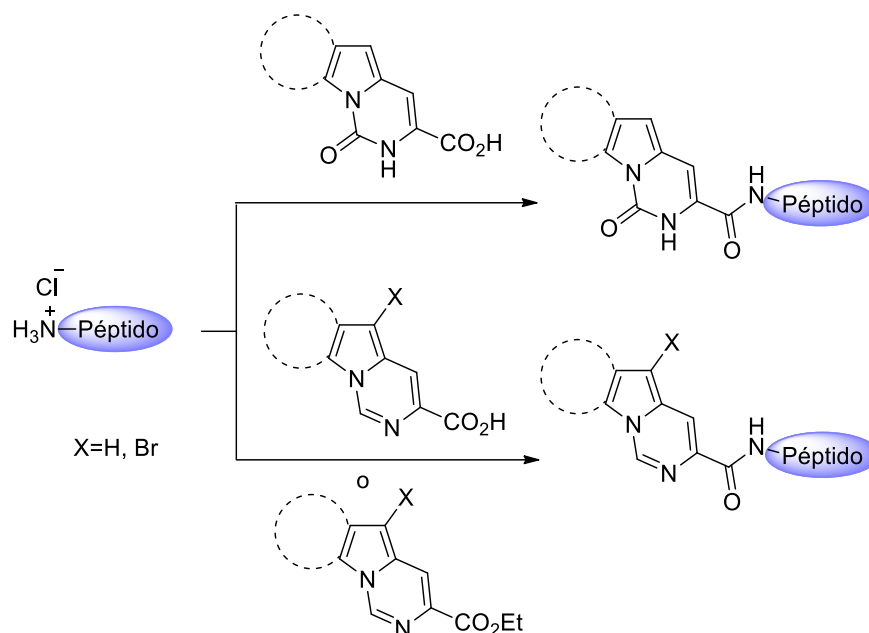
<sup>4</sup> (a) Mendiola, J.; Baeza, A.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 4974 – 4983. (b) Baeza, A.; Mendiola, J.; Burgos, C.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 4879 – 4882.

<sup>5</sup> Baeza, A.; Mendiola, J.; Burgos, C.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 5607 – 5618.



**Esquema 1.2.** Síntesis total de la Variolina B realizada en el grupo. Condiciones de reacción: i) Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (5%), THF, fosfina (10 %), LiHMDS, Ph<sub>3</sub>SiNH<sub>2</sub>; ii) Ac<sub>2</sub>O; iii) AIBN, TTMSS, THF; iv) NIS, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; v) Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, PPh<sub>3</sub>, LiCl, CuI, dioxano; vi) MeOH/ HCl; vii) NaOtBu, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (5%), tolueno/*t*BuOH, JohnPhos (10 %); viii) MeOH/HCl.

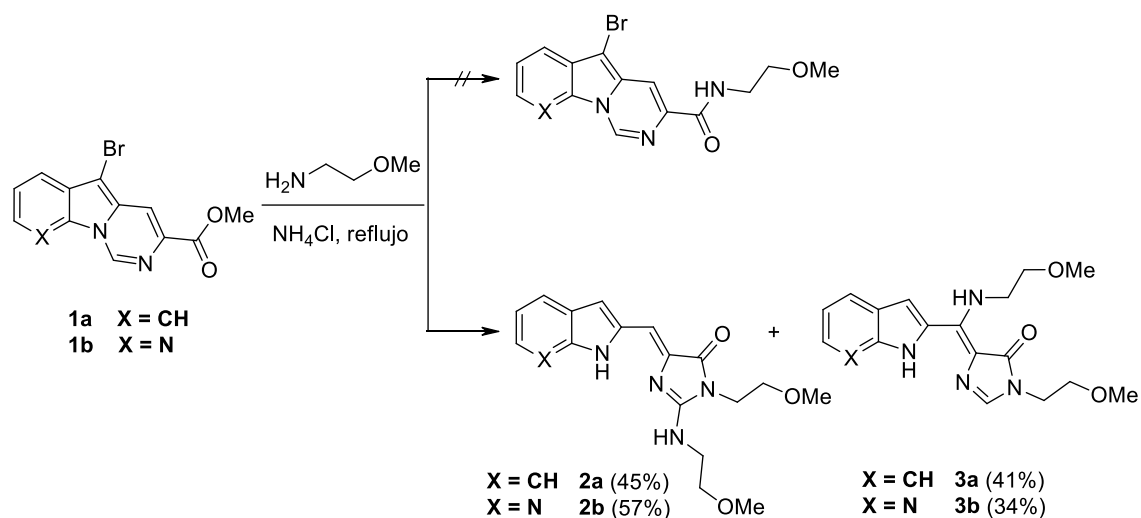
A raíz de este proyecto, el grupo se planteó la síntesis de potenciales inhibidores de calpaína del tipo híbrido péptido-heterociclo, utilizando como heterociclos los sistemas de azolo[1,2-*c*]pirimidinas obtenidos mediante la química de TosMIC. La unión de los distintos péptidos a los heterociclos se llevaría a cabo mediante la formación de un enlace amida al hacer reaccionar el péptido con el ácido carboxílico o el éster del heterociclo, estrategia que se llevó a cabo según lo esperado utilizando distintos péptidos (**Esquema 1.3**).



**Esquema 1.3.** Síntesis de híbridos péptido-heterociclo de azolopirimidinas.

Sin embargo, durante el desarrollo de este proyecto se obtuvo un resultado inesperado que acabaría por reorientar nuestras investigaciones posteriores. Este se produjo al adicionar 2-metoxietilamina sobre los ésteres de pirido[3',2':4,5]pirrolo[1,2-c]pirimidina e imidazo[1,2-c]pirimidina, lo que no condujo a la formación de la amida esperada sino a una reacción en cascada que proporcionó los productos **2** y **3** (**Esquema 1.4**). Una vez separados ambos productos, se comprobó que uno de ellos mostraba actividad inhibitoria frente a calpaínas y el otro, en cambio, resultaba inactivo pero mostraba fluorescencia. La reacción de distintas aminas primarias con estos sustratos de partida llevaba a la formación de mezclas variables de los productos **2/3**, en los que las aminas utilizadas aparecían incorporadas a las moléculas.<sup>6</sup>

<sup>6</sup> Morón, M.; Burgos, C.; Alvarez-Builla, J.; Salgado, A.; Mosquera, M. E. G.; Vaquero, J. J. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 9171 – 9173.

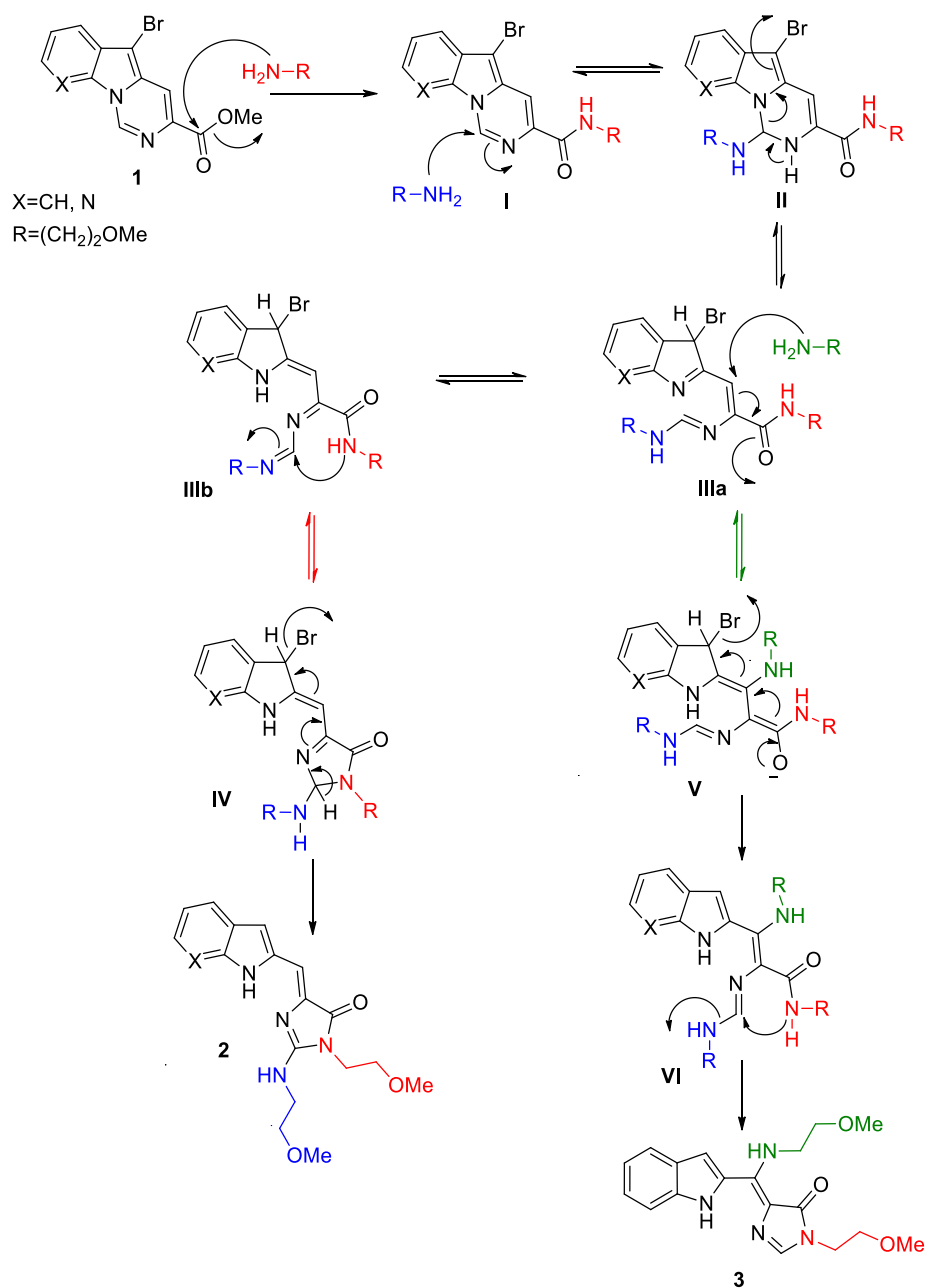


**Esquema 1.4.** Reacción de 2-metoxietilamina con los compuestos **1a/b**.

Ambos productos tienen en común un esqueleto de indolil- o azaindolilmetilenimidazolona, portando el inhibidor de calpaínas una amina en el carbono exocíclico, y el compuesto fluorescente una amina en el C2 de la imidazolona, con una estructura similar a la del cromóforo de la proteína verde fluorescente.

La formación de los compuestos **2** y **3** se explicó a través de un mecanismo detallado en el **Esquema 1.5**, que implica un proceso en cascada que se inicia con el ataque nucleofílico de la amina en la posición C2 del anillo de pirimidina, seguido de la apertura del sistema tricíclico y una ciclación posterior que genera el anillo de imidazolona.

## 1. Introducción general y objetivos



**Esquema 1.5.** Mecanismo propuesto para la formación de **2** y **3**.<sup>6</sup>



Dada la actividad que mostraron estos compuestos (inhibición de calpaínas o fluorescencia), se decidió profundizar en su síntesis diseñando una nueva metodología que permita la obtención de cada uno de ellos de forma dirigida y eficiente. Los capítulos 2 y 3 de esta tesis se dedican a estos proyectos: la síntesis de análogos del cromóforo de la GFP se trata en el capítulo 2, y el capítulo 3 está dedicado a la síntesis de inhibidores de calpaínas, realizándose los estudios fotofísicos y biológicos pertinentes en cada uno de los casos.

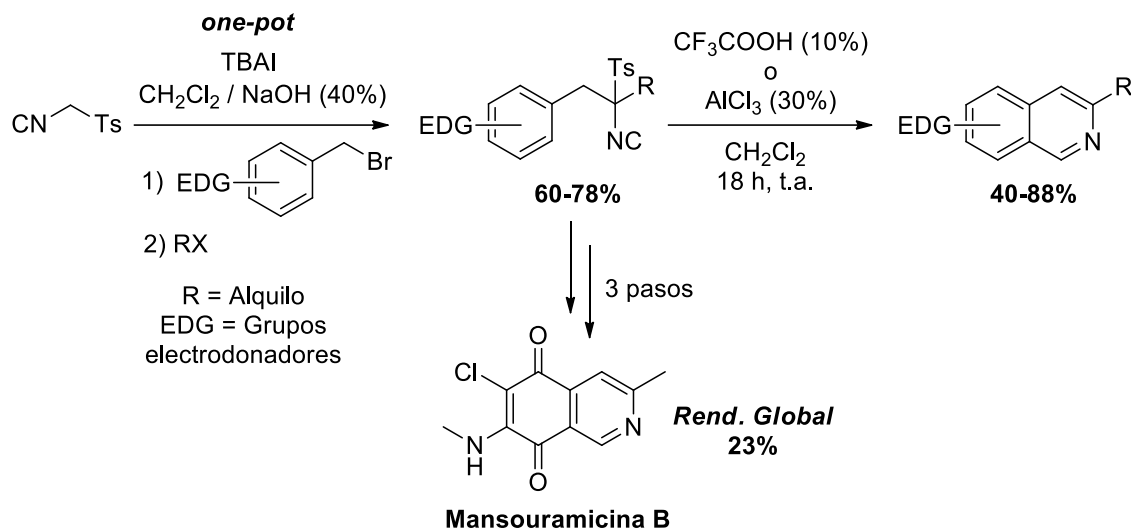
Por otro lado, continuando con el objetivo de expandir la química de TosMIC a la formación de heterociclos de seis miembros, nuestro grupo de investigación ha desarrollado recientemente una metodología para la síntesis de isoquinolinas que involucra la heterociclación de derivados de  $\alpha$ -arilmetil TosMIC,<sup>7</sup> obtenidos mediante una reacción de dialquilación del TosMIC en condiciones de transferencia de fase utilizando dos haluros alquílicos distintos de forma secuencial en un proceso *one-pot*. La heterociclación de los isonitrilos tiene lugar mediante una reacción de sustitución electrófila aromática catalizada por ácidos y constituye un método eficiente de síntesis de isoquinolinas en condiciones suaves de reacción ya que transcurre con buenos rendimientos cuando el anillo de benceno presenta sustituyentes electrodonadores. Esta metodología fue empleada con éxito en la primera síntesis total del alcaloide Mansouramicina B.<sup>8</sup>

---

<sup>7</sup> Coppola, A. *Tesis doctoral*, Universidad de Alcalá, **2015**.

<sup>8</sup> Coppola, A.; Sucunza, D.; Burgos, C.; Vaquero, J. J. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 78 – 81.

## 1. Introducción general y objetivos

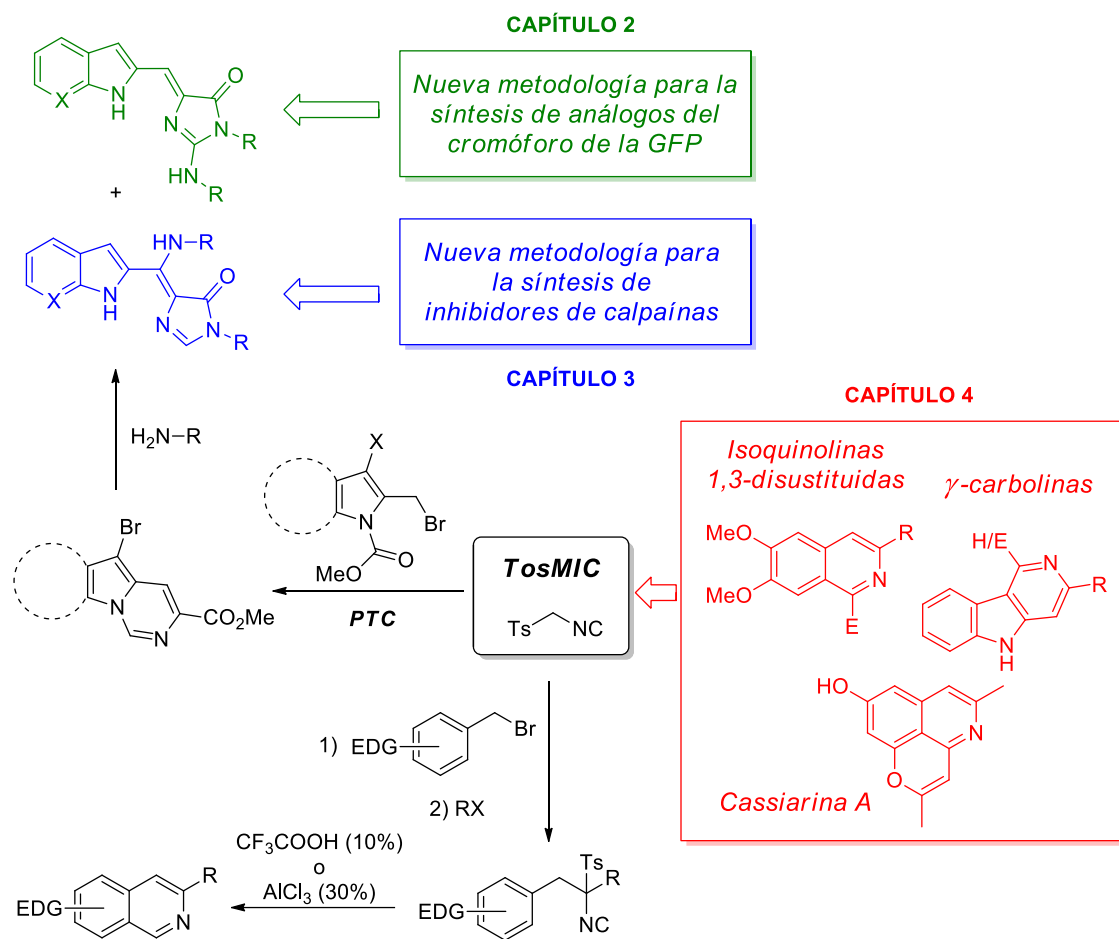


**Esquema 1.6.** Heterociclaciones con TosMIC para la síntesis de isoquinolinas. Aplicación en la síntesis total del alcaloide Mansouramicina B.

Teniendo en cuenta estos últimos resultados, se decidió continuar esta línea de trabajo y, en el capítulo 4 de esta tesis, se describe la adaptación de esta metodología a la síntesis de isoquinolinas 1,3-disustituidas mediante la utilización de distintos electrófilos en el paso de ciclación, así como a la obtención de  $\gamma$ -carbolinas partiendo de los derivados de TosMIC correspondientes. Este capítulo incluye además la aplicación de la metodología sintética desarrollada en una síntesis total del alcaloide tricíclico Cassiarina A.

El trabajo realizado durante esta tesis doctoral, por tanto, consta de tres objetivos principales que se desarrollan en los siguientes capítulos:

- Capítulo 2.** Desarrollo de una metodología sintética que permita la obtención de una familia de análogos del cromóforo de la proteína verde fluorescente (GFP) que incorporen un grupo alquilamino en el C2 de la imidazolona.
- Capítulo 3.** Desarrollo de una metodología sintética para la obtención de una serie de inhibidores de calpaína con una estructura de indolilmetilenimidazolona con una amina en el carbono exocíclico, introduciendo diversidad en varios dominios para intentar mejorar la actividad del compuesto tomado como *hit*.
- Capítulo 4.** Ampliación de la metodología de heterociclaciones con TosMIC para la síntesis de heterociclos nitrogenados.
- I. Síntesis de isoquinolinas 1,3-disustituidas.
  - II. Síntesis de  $\gamma$ -carbolinas.
  - III. Aplicación de la metodología desarrollada a la síntesis del alcaloide Cassiarina A.



**Esquema 1.7.** Trabajo previo del grupo relacionado con la tesis (en negro) y objetivos propuestos para cada uno de los capítulos de la tesis.

Además, en un Anexo se incluyen los resultados obtenidos durante la estancia predoctoral de 3 meses realizada en el grupo del Prof. Phil Baran en The Scripps Research Institute (TSRI) en San Diego (EEUU). Durante esta investigación se llevó a cabo un acoplamiento entre dos olefinas catalizado por hierro para dar lugar a una sulfona cuya diversificación estructural condujo a distintos compuestos.

## **2. Síntesis de una serie de análogos del cromóforo de la proteína verde fluorescente**

### **2.1. Antecedentes**

**2.1.1. La proteína verde fluorescente (GFP)**

**2.1.2. El cromóforo de la GFP**

### **2.2. Discusión de resultados**

**2.2.1. Introducción**

**2.2.2. Síntesis de los cromóforos**

**2.2.3. Estudio fotofísico**

**2.2.4. Estudios de RMN**

**2.2.5. Estudios de tinción celular**



## 2.1. ANTECEDENTES

### 2.1.1. LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP)

La proteína verde fluorescente, más conocida por sus siglas en inglés GFP (*Green Fluorescent Protein*) se ha convertido en las últimas décadas en una herramienta indispensable en biología molecular y celular e investigación biomédica. Su descubrimiento se debe a Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Tsien, quienes fueron galardonados con el premio Nobel en Química de 2008 como reconocimiento a varias décadas de trabajo en este campo. La capacidad de expresar esta proteína en células y organismos vivos o anclarla a otra proteína sin alterar su función o localización ha permitido su uso como trazador biológico para la visualización de procesos celulares *in vivo* en tiempo real.<sup>9</sup> A continuación se presenta un breve resumen de la historia de la GFP y su impacto en la investigación biomédica.

A comienzos de los años 60, Osamu Shimomura comenzó a trabajar en el laboratorio del Prof. Frank Johnson en la Universidad de Princeton en un proyecto encaminado a la elucidación del mecanismo de bioluminiscencia de la medusa *Aequorea aequorea* (*Aequorea victoria*). Todos los organismos bioluminiscentes conocidos hasta ese momento usaban un sistema luciferina/luciferasa. En cambio, en el caso de la *Aequorea victoria*, dos proteínas estaban implicadas en su bioluminiscencia: la aequorina y la GFP.

La medusa *Aequorea victoria* se encuentra en el noroeste del Pacífico por lo que, con el objetivo de aislar una cantidad suficiente de cada una de estas proteínas para su posterior estudio, Shimomura se desplazó cada verano durante dos décadas al laboratorio de Friday Harbor en Washington.<sup>10</sup> Se necesitaron miles de medusas para lograr extraer unos miligramos de cada proteína y aislar tanto la aequorina como la GFP, pudiendo identificar la estructura de ambas así como del cromóforo de esta última.

El mecanismo de fluorescencia de la GFP requiere de estas dos proteínas íntimamente relacionadas, localizadas en los fotoórganos de la *Aequorea victoria*. La aequorina es una proteína monomérica de 21.4 kDa que se une al calcio por tres sitios

---

<sup>9</sup> Zimmer, M. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 759 – 781.

<sup>10</sup> Zimmer, M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 2822 – 2832.

de unión. Tras unirse al  $\text{Ca}^{2+}$ , se produce una reacción intermolecular, liberándose luz de una longitud de onda de 470 nm.<sup>11</sup> Sin embargo, al encontrarse próxima la GFP, en lugar de esta luz se produce una transferencia de energía por resonancia de tipo Förster (FRET, *Förster Resonance Energy Transfer*) a la GFP, que absorbe esta radiación y emite fluorescencia verde ( $\lambda_{\text{em}} = 509 \text{ nm}$ ).

El siguiente paso significativo se produjo en el laboratorio de Prasher y Cormier, donde se llevó a cabo el clonado del gen de la proteína.<sup>12</sup> Martin Chalfie recibió el gen clonado de la GFP de Prasher y su grupo fue el primero en expresar la GFP en *Escherichia coli* y producir “cultivos verdes brillantes”, vislumbrando el potencial de esta proteína como marcador fluorescente *in vivo*. Varios científicos comenzaron a involucrarse en investigaciones orientadas a la expresión de la GFP en células de organismos vivos y en 1994 Chalfie logró la expresión de la GFP en las neuronas táctiles del nematodo *Caenorhabditis elegans*.

Por otro lado, Roger Tsien también recibió el gen clonado de la GFP de Prasher y comenzó la modificación sistemática de esta proteína para mejorar sus propiedades espectrales. En 1994 produjo una variante azul de la misma,<sup>13</sup> y actualmente existe toda una paleta de colores de la GFP, llegando hasta la región del rojo. Tsien también ha sido pionero en el desarrollo de proteínas fluorescentes que puedan actuar como biosensores, incluyendo el desarrollo de sensores de calcio intracelulares y de pH, así como indicadores redox.<sup>14</sup>

---

<sup>11</sup> Niwa H.; Inouye, S.; Hirano, T.; Matsuno, T.; Kojima, S.; Kubota, M.; Ohashi, M.; Tsuji, F. I. *PNAS* **1996**, *93*, 13617 – 13622.

<sup>12</sup> Prasher, D. C.; Eckenrode, V. K.; Ward, W. W.; Prendergast, F. G.; Cormier, M. J. *Gene* **1992**, *111*, 229 – 233.

<sup>13</sup> Heim, R.; Prasher, D. C.; Tsien, R. Y. *PNAS* **1994**, *91*, 12501 – 12504.

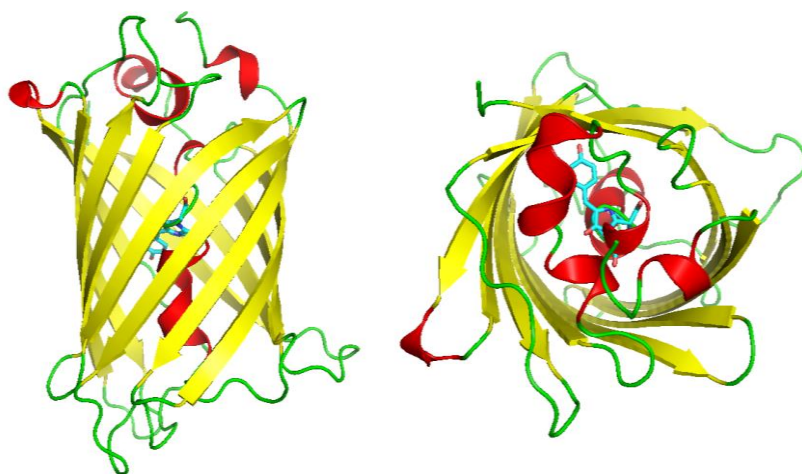
<sup>14</sup> Sanders, J. K. M.; Jackson, Sophie, E. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2821 – 2822.



### 2.1.1.2. Estructura de la proteína verde fluorescente y su cromóforo

Actualmente se pueden encontrar en el *Protein Data Bank* (PDB) cientos de estructuras de la proteína verde fluorescente así como de diversos mutantes. En este apartado únicamente se tratará el *wild-type* GFP, wGFP, aislada de la *Aequorea victoria*.

La GFP es un polipéptido de 238 aminoácidos cuya estructura terciaria se ha podido determinar por difracción de rayos X. La proteína fue cristalizada como un dímero, aunque la formación de éste es muy dependiente de las condiciones de crecimiento del cristal. Su estructura está constituida por un barril beta ( $\beta$ -can) compuesto por 11 láminas  $\beta$ , que forman un cilindro casi perfecto con un diámetro de alrededor de 24 Å y una altura de 42 Å. Una hélice alfa recorre coaxialmente el barril por su interior, y en el centro de la misma se encuentra el cromóforo, anclado covalentemente a la hélice alfa y unido mediante puentes de hidrógeno al barril beta<sup>15</sup> (**Figura 2.1**).



**Figura 2.1.** Estructura terciaria de la GFP, a la izquierda, vista frontal; a la derecha, vista superior. En ambas imágenes se muestran las láminas  $\beta$  que conforman el barril en amarillo, las hélices alfa en rojo y los *loops* en verde. En el interior del barril  $\beta$  se encuentra el cromóforo cuya estructura carbonada aparece en azul cian, los N en azul oscuro y los O en rojo.<sup>16</sup>

<sup>15</sup> Craggs, T. D. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 2865 – 2875.

<sup>16</sup> Estructura cristalina de la GFP tomada del *Protein Data Bank*, código 1GFL.

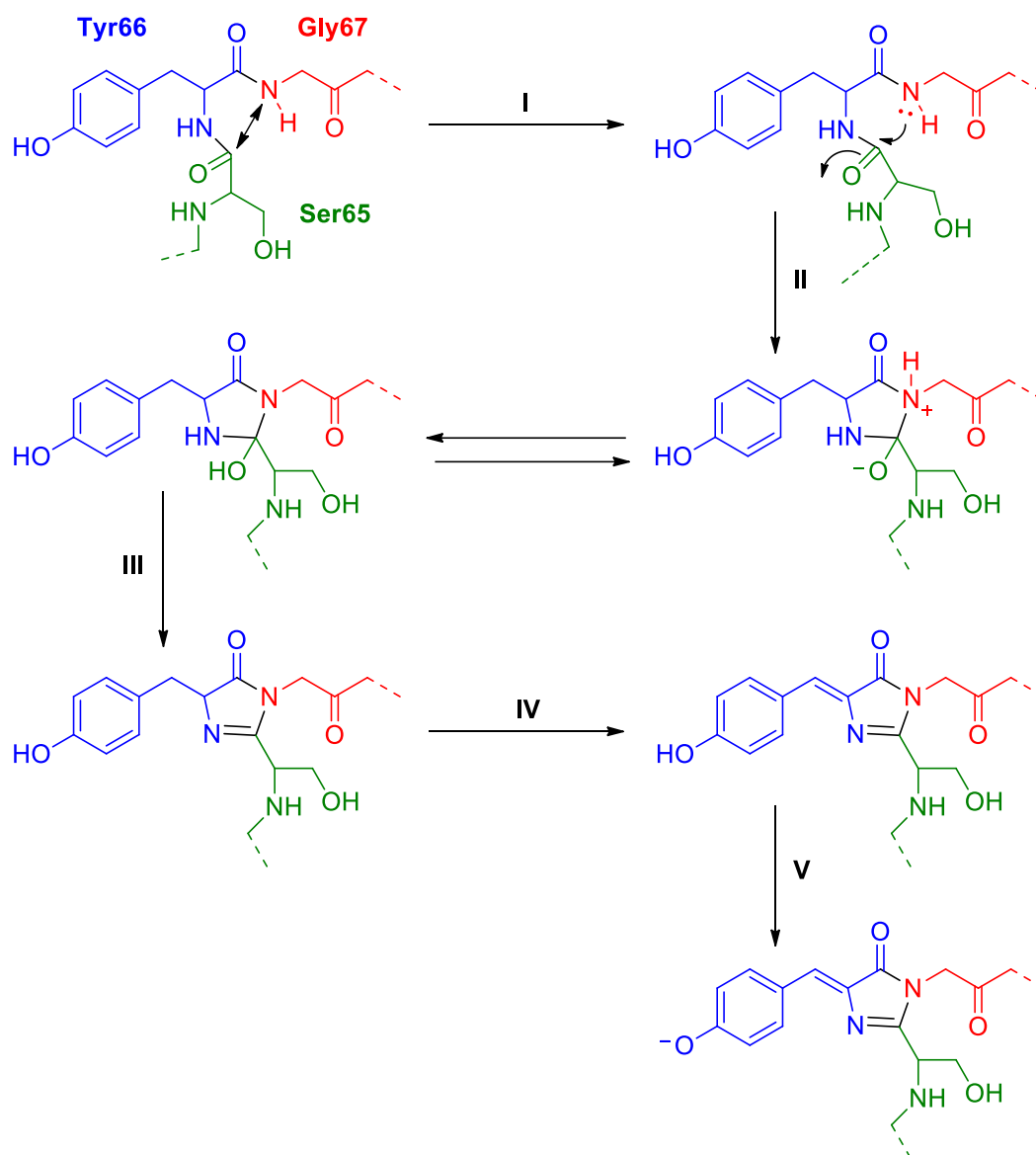
Como se observa en la estructura de la proteína, el cromóforo constituye una parte intrínseca del esqueleto de la misma, lo que resulta determinante para sus aplicaciones y diferencia a la GFP de muchas otras proteínas coloreadas, en las cuales el cromóforo se une mediante interacciones no covalentes y por lo tanto puede intercambiarse con el entorno.<sup>17</sup>

El cromóforo de la GFP es un derivado de la *para*-hidroxibencilidenimidazolona, formado por ciclación autocatalítica post-traducciona del esqueleto de la proteína. En la formación del cromóforo interviene la ciclación de los aminoácidos Ser65-Tyr66-Gly67 (serina, tirosina y glicina, que ocupan las posiciones 65, 66 y 67 en la secuencia de la proteína), seguida de una deshidratación y posterior oxidación de la estructura formada. Este proceso se lleva a cabo sin necesidad de cofactor, y con oxígeno molecular como único requerimiento externo.

La formación del cromóforo se muestra en el **Esquema 2.1**, y comienza con el plegamiento de la proteína, un proceso en el cual la GFP adopta la conformación necesaria para la posterior ciclación, logrando el acercamiento entre los residuos Ser65 y Gly67 (**I**). En segundo lugar, tiene lugar la ciclación, mediante un ataque nucleófilo del nitrógeno de la amida de Gly67 sobre el carbono carbamídico de Ser65 (**II**). Posteriormente se produce la deshidratación del compuesto (**III**), y finalmente la oxidación del cromóforo por oxígeno molecular en un paso lento determinante de la velocidad de todo el proceso (**IV**).<sup>9</sup> Tras una pérdida de protón del grupo hidroxilo el cromóforo pasa a su forma aniónica (**V**).

---

<sup>17</sup> Meech, S. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 2922 – 2934.



**Esquema 2.1.** Formación del cromóforo de la GFP. (I) Plegamiento de la proteína, acercamiento entre los residuos Ser65 y Gly67. (II) Ciclación. (III) Deshidratación. (IV) Oxidación. (V) Pérdida de protón para generar la forma aniónica.

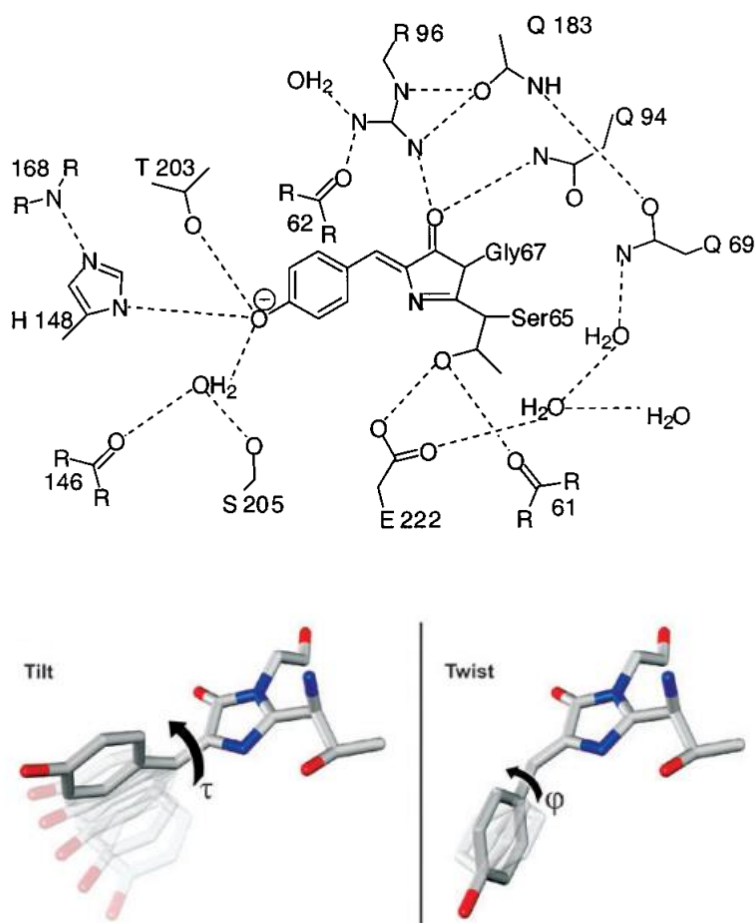
En el interior de la proteína, el cromóforo exhibe fluorescencia verde cuando es sometido a luz ultravioleta, con un rendimiento cuántico de fluorescencia del 80% ( $\Phi_F = 0.8$ ). Sin embargo, cuando se encuentra fuera del barril  $\beta$ , bien por desnaturalización<sup>18</sup> de la proteína o por síntesis independiente, se observa un decaimiento del rendimiento cuántico de fluorescencia de 4 órdenes de magnitud.<sup>19</sup> Este hecho es indicativo de la vital importancia del entorno de la proteína para el mantenimiento de la fluorescencia. El cromóforo se encuentra en la proteína en su forma *cis* (Z, fluorescente), mientras que en su forma *trans* (E) no muestra fluorescencia. El barril  $\beta$  tiene un papel fundamental en la fluorescencia del cromóforo por varios motivos:

- La red de puentes de hidrógeno entre el cromóforo y moléculas de agua dentro del barril, así como con residuos de cadenas laterales del propio barril, como por ejemplo Ser205, Glu222 o Gln69, contribuye a la rigidez del cromóforo dentro de la proteína, y evita la desactivación del estado excitado del cromóforo por vías no radiantes, como la fotoisomerización *cis/trans* (Z/E) por rotaciones del enlace sencillo o el doble enlace (en el estado excitado) que forman el puente entre el anillo de imidazolona y el de *para*-fenol, así como la rotación conocida como “*hula-twist*” (**Figura 2.2**).<sup>10</sup>
- En el interior del barril  $\beta$  el cromóforo se encuentra encapsulado, protegido del *quenching* por oxígeno molecular, evitándose de este modo desactivaciones del estado excitado por vías distintas a la fluorescencia.

---

<sup>18</sup> Ward, W. W.; Bokman, S. H. *Biochemistry* **1982**, *21*, 4535 – 4540.

<sup>19</sup> (a) Litvinenko, K. L.; Webber, N. M.; Meech, S. R. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 2616 – 2623. (b) Tolbert, L. M.; Baldrige, A.; Kowalik, J.; Solntsev, K. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 171 – 181.



**Figura 2.2.** Arriba, diagrama esquemático de los puentes de H formados entre el cromóforo y el barril  $\beta$ , así como con moléculas de agua del entorno. Abajo, rotaciones de enlace posibles en el cromóforo de la GFP, izquierda en el estado excitado y derecha en el estado fundamental. Imágenes tomadas de las referencias 9 y 10.

### 2.1.1.3. Aplicaciones de la GFP

La proteína verde fluorescente se ha convertido en una molécula tremendamente útil con aplicaciones en varias áreas científicas y médicas. A continuación se presentan los campos en los que se sitúan algunas de las más relevantes.

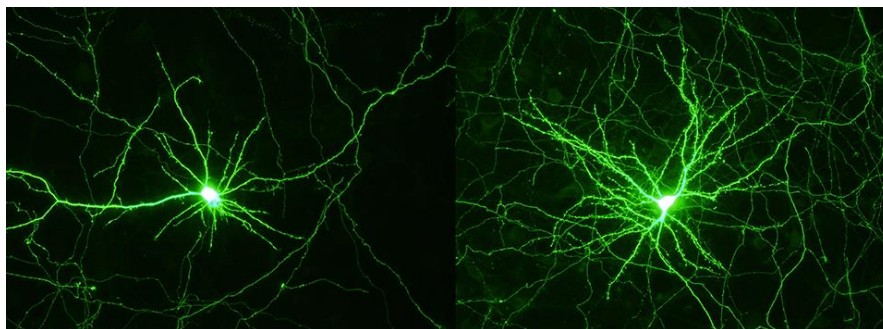
- **Biología celular.** La utilización de la GFP como marcador fluorescente en el extremo N- o C- terminal de proteínas permite la monitorización y localización *in vivo* de la proteína fusionada mediante microscopía de fluorescencia, así como la visualización de procesos de dinámica celular. Las fusiones de proteínas con la GFP mejoran la sensibilidad y resolución comparada con las técnicas estándar de tinción con anticuerpos. Por ejemplo, mediante esta técnica se ha podido llevar a cabo el estudio de la progresión del ciclo celular,<sup>20</sup> y la fusión de la GFP con receptores nucleares específicos ha proporcionado un método potente de detección de la función y movilidad de factores nucleares *in vivo*.<sup>21</sup>
- **Biotecnología.** La GFP ha sido utilizada para la monitorización de la expresión celular en células vivas de forma no invasiva, a nivel de una única célula. Esta aproximación presenta ventajas respecto a otros métodos como el uso de cloranfenicol acetil transferasa o  $\beta$ -galactosidasa ya que pueden tomarse distintas lecturas en la misma célula bajo diferentes condiciones y no requiere técnicas de fijación y preparación de la muestra.<sup>22</sup>
- **Neurobiología.** La capacidad de creación de organismos transgénicos con neuronas coloreadas mediante estrategias genéticas que involucran proteínas fluorescentes ha permitido hacer un mapa de los circuitos neuronales del cerebro.<sup>10</sup>

---

<sup>20</sup> Kain, S. R. *Drug Discov.Today* **1999**, 4, 304 – 312.

<sup>21</sup> Htun, H.; Holth, L. T.; Walker, D.; Davie, J. R.; Hager, G. L. *Mol. Biol. Cell.* **1999**, 10, 471 – 486.

<sup>22</sup> Misteli, T. and Spector, D. L. *Nature Biotechnology* **1997**, 15, 961 – 964.



**Figura 2.3.** Neuronas expresando GFP en ausencia (izquierda) o presencia (derecha) de un ligando de RNA E2F1. Imagen tomada de la página web del Mahoney Institute for Neurosciences, de la Universidad de Pensilvania. Crédito: Kelly Jordan-Sciutto.

- **Microscopía óptica.** La GFP, junto con otras proteínas fluorescentes, puede ser utilizada como marcador óptico. Las FPs (Proteínas Fluorescentes) fotoactivables pueden modificar su fluorescencia desde niveles muy bajos hasta elevadas emisiones de fluorescencia tras su iluminación con luz violeta o ultravioleta. Por su parte, las FPs fotoconvertibles pueden ser convertidas ópticamente desde una emisión a una anchura de banda hasta otra. En contraste con éstas, las FPs *photoswitchables* pueden mostrar distinto comportamiento de emisión con una iluminación específica. Las variantes de GFP utilizadas como FPs fotoconvertibles que pueden ser activadas de forma irreversible son excelentes marcadores en microscopía óptica de super-resolución basada en localización.<sup>23</sup>
- **Sensores fluorescentes.** Se han desarrollado sondas basadas en proteínas fluorescentes genéticamente codificadas para la detección selectiva de distintos metales y compuestos, por ejemplo de sulfuro de hidrógeno<sup>24</sup> capaces de monitorizar este compuesto en células de mamíferos.

<sup>23</sup> Day, R. N.; Davidson, M. W. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 2887 – 2921.

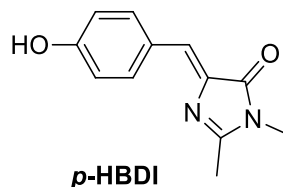
<sup>24</sup> Chen, S.; Chen, Z.; Ai, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 9589 – 9592.

## 2.1.2. EL CROMÓFORO DE LA GFP

### 2.1.2.1. Estructura del cromóforo

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, el cromóforo de la proteína verde fluorescente tiene un esqueleto de *para*-hidroxibencilidenimidazolona, y es el responsable de la fluorescencia de la proteína. Cuando se encuentra en el interior de la proteína, el cromóforo exhibe fluorescencia verde al ser sometido a luz ultravioleta, con un rendimiento cuántico de fluorescencia del 80% ( $\Phi_F = 0.8$ ).

Dado el elevado rendimiento cuántico de fluorescencia que presenta la GFP, se pensó en aislar su cromóforo para utilizarlo como molécula fluorescente en distintas aplicaciones. Sin embargo, al desnaturalizar la proteína el cromóforo pierde su fluorescencia.<sup>17</sup> También se realizó la síntesis de diversos análogos del cromóforo. El más sencillo, el (Z)-5-(4-hidroxibenciliden)-2,3-dimetil-3,5-dihidro-4*H*-imidazol-4-ona (*p*-HBDI, **Figura 2.4**), no exhibe fluorescencia significativa en disolución acuosa. La fluorescencia del *p*-HBDI muestra una alta dependencia de la temperatura, y en disolución acuosa a temperatura ambiente el rendimiento cuántico de fluorescencia muestra un descenso de 4 órdenes de magnitud ( $\Phi_F = 0.0002$ , 0.02%) respecto al cromóforo en el interior de la proteína.



**Figura 2.4.** Estructura de *p*-HBDI, el análogo más sencillo del cromóforo de la GFP.

Estos resultados sugieren transiciones no radiantes eficientes en el *p*-HBDI, probablemente inducidas por relajación conformacional a lo largo de la deformación torsional de los 2 enlaces C-C exocíclicos dando un intermedio *twisted* no fluorescente.<sup>25</sup> La relajación conformacional se suprime en gran medida en la GFP

<sup>25</sup> (a) Usman, A.; Mohammed, O. F.; Nibbering, E. T. J.; Dong, J.; Kyril M. Solntsev Tolbert, L. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11214 – 11215. (b) Stavrov, S. S.; Solntsev, K. M.; Tolbert, L. M.; Huppert,



mediante el entorno rígido de la proteína, que envuelve al cromóforo evitando de este modo la desactivación del mismo por vías distintas a la fluorescencia.

#### 2.1.2.2. Análogos sintéticos del cromóforo de la GFP

En los últimos años se han desarrollado diversas estrategias de síntesis de análogos del cromóforo de la GFP con el objetivo de mejorar el rendimiento cuántico de fluorescencia respecto al *p*-HBDI. A continuación se exponen algunos ejemplos representativos de las estrategias más utilizadas para ello, la mayoría centradas en el aumento de la rigidez estructural del mismo, evitando de este modo las isomerizaciones *cis/trans* (*Z/E*) que tienen como consecuencia una disminución del rendimiento cuántico de fluorescencia.

##### 2.1.2.2.1. Formación de un puente de hidrógeno intramolecular

Chen *et al.* diseñaron un análogo del cromóforo de la GFP utilizando como estrategia la modificación del anillo de fenol, mediante el cambio del grupo hidroxilo desde la posición C8 a la C6. Sintetizaron así el *o*-HBDI, un isómero estructural del *p*-HBDI en el cual el grupo hidroxilo se encuentra en posición *orto*.

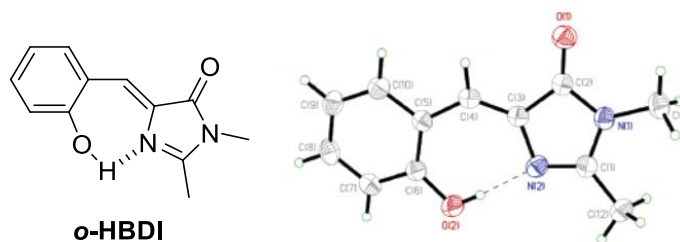
En el *o*-HBDI tiene lugar una transferencia de protón intramolecular ultra rápida en el estado excitado (ESIPT)<sup>26</sup> del protón del grupo hidroxilo al nitrógeno más cercano al doble enlace exocíclico de la imidazolona. De este modo, se consigue reducir la desactivación por vías no radiantes al rigidizar la estructura mediante la formación de un anillo de 7 miembros en el que interviene el puente de hidrógeno.<sup>27</sup>

---

D. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1540 – 1546. (c) Gepshtein, R.; Huppert, D.; Agmon, N. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 4434 – 4442.

<sup>26</sup> Zhao, J. Z.; Ji, S. M.; Chen, Y. H.; Guo, H. M.; Yang, P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 8803 – 8817.

<sup>27</sup> Chen, K.-Y.; Cheng, Y.-M.; Lai, C.-H.; Hsu, C.-C.; Ho, M.-L.; Lee, G.-H.; Chou, P.-T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4534 – 4535.



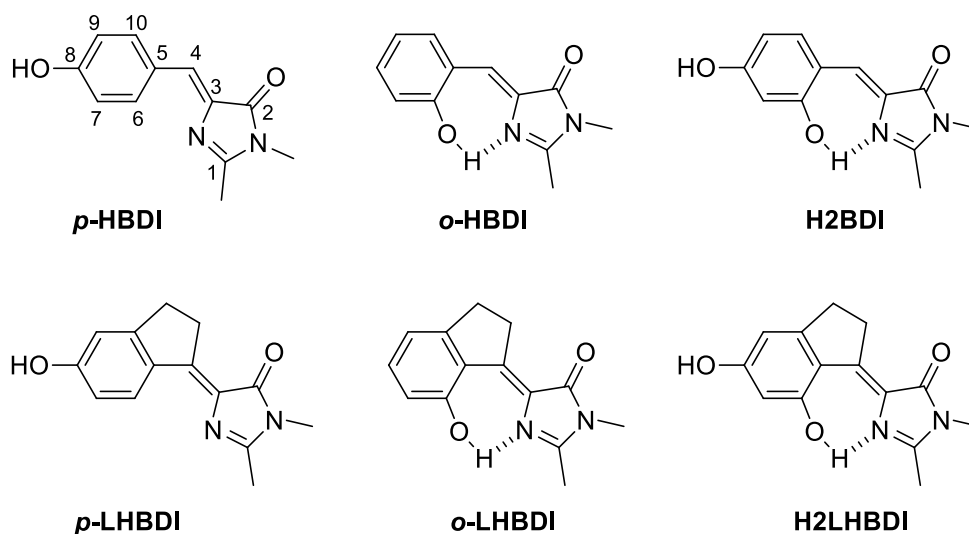
**Figura 2.5.** Estructura de *o*-HBDI (estructura cristalina representada a la derecha).

No obstante, mediante esta derivatización el aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia en agua a pH neutro respecto al *p*-HBDI es pequeño, no llegando a un orden de magnitud ( $\Phi_F = 0.09\%$ ). En otros disolventes, como diclorometano o ciclohexano es ligeramente superior ( $\Phi_F = 0.22\%$  y  $0.31\%$ , respectivamente).

#### 2.1.2.2.2. Formación de un puente carbonado

Dado el bajo incremento del rendimiento cuántico de fluorescencia del *o*-HBDI respecto a su isómero estructural, Chen *et al.* buscaron nuevas estrategias para aumentar la restricción estructural del cromóforo. En 2014 trataron de aumentar la rigidez del cromóforo mediante el bloqueo de la rotación del enlace entre los carbonos C4 y C5 de los análogos *p*-HBDI, *o*-HBDI y un nuevo análogo con dos grupos hidroxilo, en *orto* y *para*, al que llamaron H2BDI. Esta restricción estructural fue llevada a cabo mediante la ciclación de los carbonos C4-C5-C6, mediante un enlace etilo entre los carbonos C4 y C10 formando un anillo de 5 miembros, dando lugar a los conformeros *p*-LHBDI, *o*-LHBDI y H2LHBDI.<sup>28</sup>

<sup>28</sup> Hsu, Y.-H.; Chen, Y.-A.; Tseng, H.-W.; Zhang, Z.; Shen, J.-Y.; Chuang, W.-T.; Lin, T.-C.; Lee, C.-S.; Hung, W.-Y.; Hong, B.-C.; Liu, S.-H.; Chou, P.-T. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11805 – 11812.

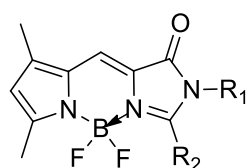


**Figura 2.6.** Estructuras de *p*-HBDI, *o*-HBDI, H2BDI y sus análogos con restricción estructural *p*-LHBDI, *o*-LHBDI, H2LHBDI.

Para los 3 nuevos compuestos con restricción estructural se observó un aumento en los rendimientos cuánticos de fluorescencia respecto a los análogos no restringidos. Aunque los análogos *p*-LHBDI y H2LHBDI muestran un  $\Phi_F = 0.051\%$  y  $0.23\%$  en agua, respectivamente, en el caso del *o*-LHBDI el rendimiento cuántico de fluorescencia en disolventes como tolueno, diclorometano o acetonitrilo aumenta hasta un  $\Phi_F = 18\%$ ,  $10\%$  y  $9\%$ , respectivamente. Tomando como ejemplo el diclorometano, se produce un aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia de 2 órdenes de magnitud respecto al *o*-HBDI. Además, debido a su reducida anchura de banda de emisión, el *o*-LHBDI pudo ser utilizado como material monocromático de iluminación en un OLED.

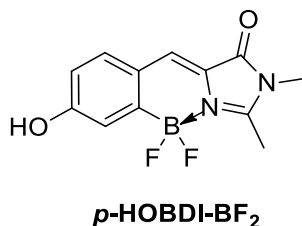
### 2.1.2.2.3. Complejación con boro

Wu y Burgess desarrollaron una aproximación alternativa, mediante la utilización de un ácido de Lewis, un grupo  $\text{BF}_2$  para restringir la rotación del enlace aril-alqueno. En este estudio, el resto arilo se sustituye por un pirrol y la conformación se fija de forma irreversible formando un ciclo de 6 miembros que incluye el átomo de boro.<sup>29</sup> Algunos de los complejos sintetizados con un puente  $\text{BF}_2$  presentan rendimientos cuánticos de fluorescencia del orden de los BODIPY, llegando al 89% en metanol y al 87% en un buffer de fosfato de litio 0.1 M (pH = 7.4).



**Figura 2.7.** Estructura de un análogo del cromóforo de la GFP complejado con boro.

Baranov *et al.* sintetizaron un análogo similar, bloqueando la conformación del *p*-HBDI con el grupo  $\text{BF}_2$ , dando lugar al análogo *p*-HOBDI- $\text{BF}_2$ , con un rendimiento cuántico de fluorescencia en acetonitrilo del 73%.<sup>30</sup>



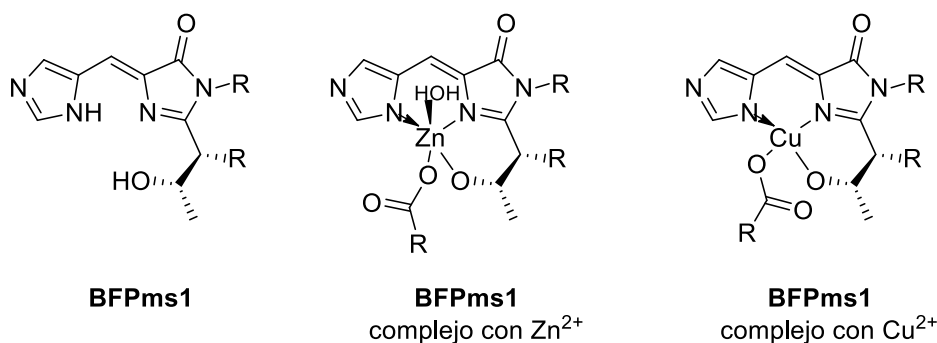
**Figura 2.8.** Estructura del análogo *p*-HOBDI- $\text{BF}_2$ .

<sup>29</sup> Wu, L.; Burgess, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4089 – 4096.

<sup>30</sup> Baranov, M. S.; Lukyanov, K. A.; Borissova, A. O.; Shamir, J.; Kosenkov, D.; Slipchenko, L. V.; Tolbert, L. M.; Yampolsky, I. V.; Solntsev, K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6025 – 6032.

#### 2.1.2.2.4. Complejación con metales

Barondeau *et al.* sintetizaron una mutante de la GFP llamada BFPms1, y demostraron su capacidad de unión a  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ .<sup>31</sup> Esta proteína sirvió como biosensor de metales, incorporando un nuevo fluoróforo tipo porfirina como ligando tridentado que se une de forma preferente a  $\text{Zn(II)}$  y  $\text{Cu(II)}$  con distintas geometrías de coordinación y propiedades espectroscópicas distinguibles, produciéndose un cambio en las propiedades de fluorescencia al formar el complejo con metales (cuando se une a  $\text{Zn}^{2+}$  se produce un aumento de la intensidad de fluorescencia y al unirse a  $\text{Cu}^{2+}$  un *quenching* de la fluorescencia). Los datos de rayos X revelaron la pentacoordinación del  $\text{Zn(II)}$ , incluyendo al ligando bidentado, y los residuos Thr65 y Glu222, así como una molécula de agua. Teniendo en cuenta estas consideraciones, la BFPms1 puede utilizarse como prototipo de biosensor de  $\text{Zn(II)}$  para aplicaciones biomédicas.



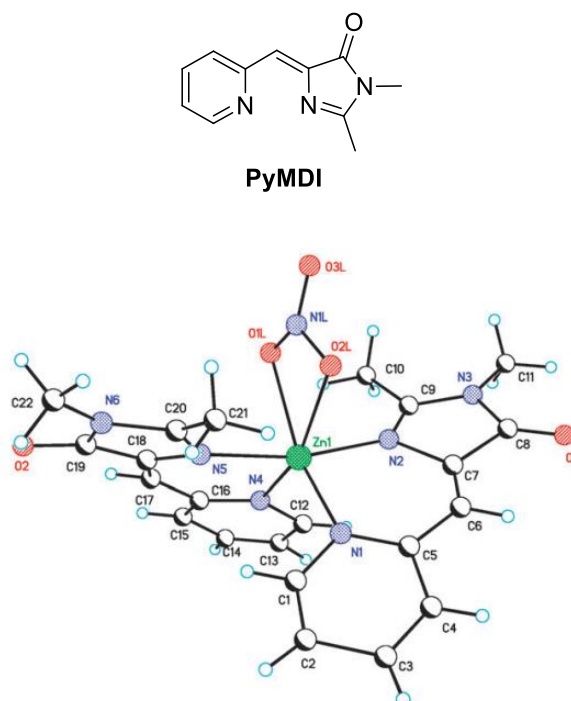
**Figura 2.9.** BFPms1, su complejo con  $\text{Zn(II)}$  y con  $\text{Cu(II)}$ .

En 2010, Baldrige *et al.* aplicaron una estrategia similar, reemplazando el resto fenilo en *p*-HBDI por piridina obteniendo de esta manera el PyMDI, un ligando bidentado que tras complejación con metales resultaría en un aumento reversible de la fluorescencia.<sup>32</sup> Tras tratamiento de PyMDI con disoluciones  $10^{-5}$  M de distintos metales, se comprobó que en el caso de sales de  $\text{Zn(II)}$  ( $\text{Zn(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) se producía un incremento significativo en la fluorescencia y sales de  $\text{Cd(II)}$  producían un

<sup>31</sup> Barondeau, D. P.; Kassmann, C. J.; Tainer, J. A.; Getzoff, E. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3522 – 3524.

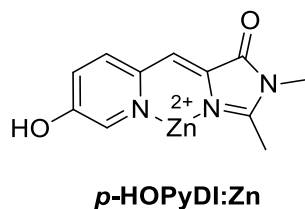
<sup>32</sup> Baldrige, A.; Solntsev, K. M.; Song, C.; Tanioka, T.; Kowalik, J.; Hardcastle, K.; Tolbert, L. M. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5686 – 5688.

comportamiento similar pero menos acusado. Mediante difracción de rayos X se pudo determinar la estructura del complejo de Zn, determinando la hexacoordinación del metal a 2 moléculas de PyMDI y un anión nitrato.



**Figura 2.10.** Arriba, estructura del análogo PyMDI. Abajo, estructura cristalina del complejo con Zn(II).

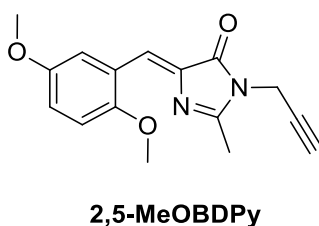
En 2012, Baranov *et al.* introdujeron un grupo hidroxilo en el anillo de piridina en *para* respecto al puente metilénico, dando lugar al *p*-HOPyDI, y utilizaron este compuesto para complejar Zn(II). Este complejo no muestra un aumento de fluorescencia tan notable como en el caso del PyMDI descrito por Baldrige pero tiene como peculiaridad propiedades de superácido, siendo el primer ejemplo de super fotoacidez en complejos metaloorgánicos.<sup>30</sup>



**Figura 2.11.** Estructura de *p*-HOPyDI:Zn.

#### 2.1.2.2.5. Auto-restricción de la conformación

En 2016, Deng *et al.* desarrollaron una estrategia diferente, basada en la supresión de la rotación del enlace exocíclico C-C mediante la introducción de 2 sustituyentes alquiloxi en el anillo de fenilo. Estas “colas” carbonadas ejercen un efecto de auto-restricción de la rotación por el propio cromóforo, traducándose en un aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia. El valor más elevado se obtuvo en DMSO, con un  $\Phi_F = 18.2\%$  para el 2,5-MeOBDPy.<sup>33</sup>

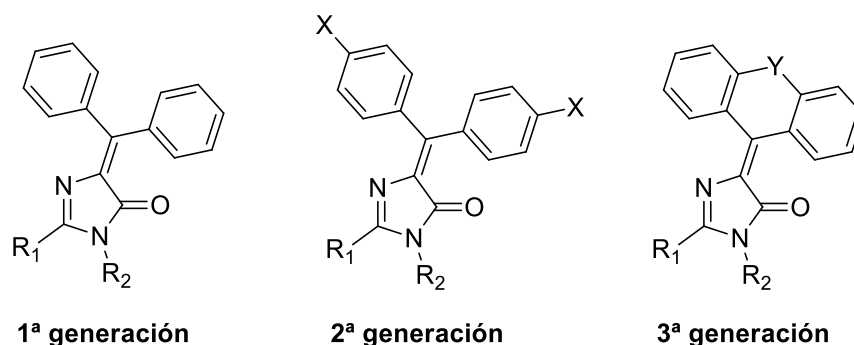


**Figura 2.12.** 2,5-MeOBDPy.

El grupo de Miyashita utilizó otra estrategia de restricción de la conformación mediante la introducción de otro anillo de fenilo en el carbono puente del *p*-HBDI, generando análogos 4-(diarilmetilen)-imidazolona DAIN con distintos sustituyentes, o mediante la introducción de un sustituyente común formando un puente entre los dos fenilos.<sup>34</sup>

<sup>33</sup> Deng, H.; Yu, C.; Gong, L.; Zu, X. *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, 7, 2935 – 2944.

<sup>34</sup> Ikejiri, M.; Matsumoto, K.; Hasegawa, H.; Yamaguchi, D.; Tsuchino, M.; Chihara, Y.; Yamaguchi, T.; Mori, K.; Imanishi, T.; Obika, S.; Miyashita, K. *Tetrahedron* **2015**, 71, 4987 – 4998.



**Figura 2.13.** Análogos DAIN de 1ª, 2ª y 3ª generación.

Los análogos de 1ª generación buscan la retención de la configuración *Z* del doble enlace, evitando la posibilidad de isomerización. Con la 2ª generación se evaluó el efecto de los sustituyentes en *para* en la fluorescencia, y en la 3ª generación el puente entre los dos fenilos consigue la restricción de la rotación del enlace C-fenilo y un aumento de la planaridad de la estructura. Estudios de fluorescencia revelaron que los compuestos de las 3 generaciones prácticamente no exhibían fluorescencia en disolución. En contraste, se observaba fluorescencia a simple vista en estado sólido cristalino, con rendimientos cuánticos de fluorescencia muy superiores a los del *p*-HBDI, llegando a un  $\Phi_F = 33.6\%$  en uno de los análogos de 1ª generación.

#### 2.1.2.2.6. Encapsulamiento

Baldrige *et al.* basaron su estrategia en el confinamiento del cromóforo en un entorno que imitara el barril  $\beta$  de la GFP. Para ello eligieron una cavidad hidrofóbica<sup>35</sup> llamada octaacid (OA),<sup>36</sup> así como sales biliares, moléculas anfifílicas con un lado cóncavo hidrofílico y un lado convexo hidrofóbico que forman agregados en disoluciones acuosas.<sup>37</sup>

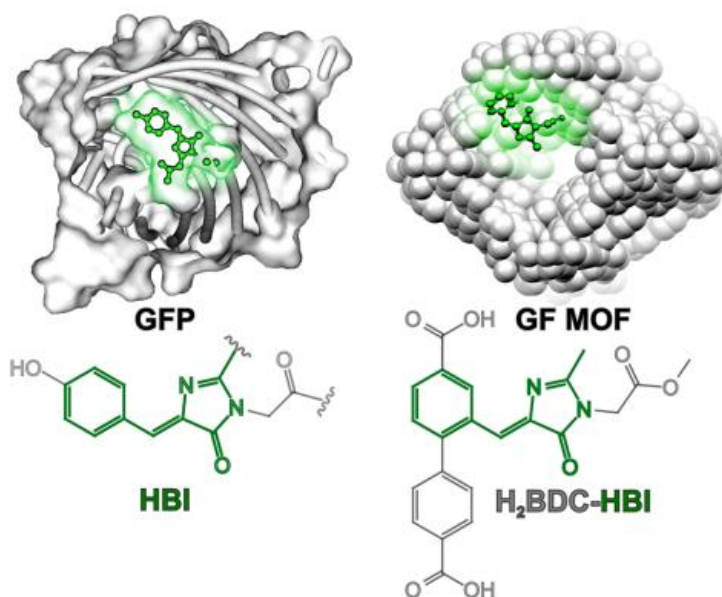
<sup>35</sup> (a) Baldrige, A.; Samanta, S. R.; Jayaraj, N.; Ramamurthy, V.; Tolbert, L. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1498 – 1499. (b) Baldrige, A.; Samanta, S. R.; Jayaraj, N.; Ramamurthy, V.; Tolbert, L. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 712 – 715.

<sup>36</sup> (a) Gibb, C. L. D.; Gibb, B. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11408 – 11409. (b) Jayaraj, N.; Zhao, Y.; Parthasarathy, A.; Porel, M.; Liu, R. S. H.; Ramamurthy, V. *Langmuir* **2009**, *25*, 10575 – 10586.

<sup>37</sup> Baldrige, A.; Amador, A.; Tolbert, L. M. *Langmuir* **2011**, *27*, 3271 – 3274.



Williams *et al.*, por su parte, imitaron la estructura de barril  $\beta$  de la GFP mediante estructuras porosas extendidas diseñadas artificialmente, *metal-organic frameworks* (MOFs) y confinaron cromóforos análogos al de la GFP en su interior.<sup>38</sup> Pudieron comprobar que los fluoróforos atrapados coordinativamente exhibían propiedades fotofísicas similares a las de la GFP, como por ejemplo el máximo de emisión.



**Figura 2.14.** A la izquierda, GFP con el cromóforo hidroxibencilidenimidazolona (HBI) en verde. A la derecha, MOF construido a partir del análogo H<sub>2</sub>BDC-HBI.<sup>38</sup>

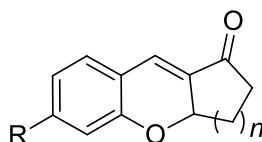
El grupo de Bols<sup>39</sup> trató de mimetizar la estructura de la GFP mediante la utilización de  $\beta$ -ciclodextrinas, logrando doblar el rendimiento cuántico de fluorescencia respecto al cromóforo fuera de esta estructura.

<sup>38</sup> (a) Williams, D. E.; Dolgoplova, E. A.; Pellechia, P. J.; Palukoshka, A.; Wilson, T. J.; Tan, R.; Maier, J. M.; Greytak, A. B.; Smith, M. D.; Krause, J. A.; Shustova, N. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 2223 – 2226. (b) Dolgoplova, E. A.; Moore, T. M.; Fellows, W. B.; Smith, M. D.; Shustova, N. B. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 9884 – 9891.

<sup>39</sup> Cacciarini M.; Nielsen, M. B.; de Castro, E. M.; Marinescu, L.; Bols, M. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 973 – 976.

#### 2.1.2.2.7. Formación de un puente oxigenado

Yuan *et al.* describieron un nuevo tipo de análogos en los que un oxígeno actúa de puente entre ambos anillos y los nitrógenos de la imidazolona han sido sustituidos por carbonos. Estos compuestos, llamados GTPOC,<sup>40</sup> tienen una conformación rígida que evita la isomerización *E/Z*, y han sido utilizados como sensores fluorescentes de 2 fotones para la detección de tioles.



GCTPOC

Figura 2.15. Estructura de GCTPOC.

#### 2.1.2.3. Aplicaciones de cromóforos análogos al de la GFP

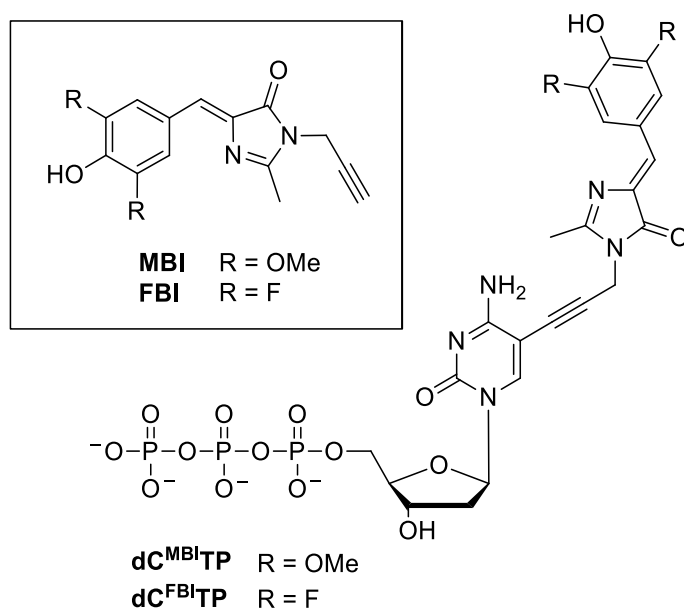
Aparte de las ya mencionadas previamente, como su uso en OLEDs o como biosensores para distintos iones, se han desarrollado diversas aplicaciones como las que se mencionan a continuación:

##### - *DNA labels* para el estudio de las interacciones DNA-proteína

Riedl *et al.* sintetizaron análogos del *p*-HBDI con modificaciones en el resto arilo y un grupo propargilo unido al nitrógeno amídico de la imidazolona (MBI y FBI) y los unieron a nucleósido trifosfatos (dNTPs). Posteriormente los incorporaron al DNA, con el objetivo de que mostraran un aumento de la fluorescencia tras la unión del DNA a una proteína debido a la restricción de la rotación de los fluoróforos.<sup>41</sup> Los ensayos se realizaron utilizando como proteína de unión al DNA p53, un importante supresor tumoral y regulador del ciclo celular, produciéndose un aumento ratiométrico de la intensidad de MBI y FBI tras la unión a la proteína, y observándose además, en el caso de MBI, una emisión dual.

<sup>40</sup> Yuan, L.; Lin, W.; Chen, H.; Zhu, S.; He, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 10018 – 10022.

<sup>41</sup> Riedl, J.; Ménová, P.; Pohl, R.; Orság, P.; Fojta, M.; Hocek, M. *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 8287 – 8293.

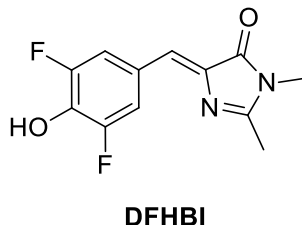


**Figura 2.16.** Arriba, MBI y FBI. Abajo, unión de MBI y FBI a nucleósido trifosfatos dNTPS.

#### - *Labeling* de RNA diana utilizando aptámeros

Quizá la aplicación con un desarrollo más avanzado hasta la fecha para cromóforos análogos al de la GFP es el *labeling* de RNA diana mediante el uso de aptámeros. Esta aproximación fue sugerida por Jaffrey y *col.* en 2011, generando aptámeros de RNA que se unen específicamente a algunos cromóforos análogos al de la GFP. Estos aptámeros activan fuertemente la fluorescencia de los cromóforos (hasta en 3 órdenes de magnitud) debido a restricciones estéricas de los mismos tras su unión al aptámero. El par con mayor fluorescencia consistió en un aptámero de 98 nucleótidos llamado Spinach y el cromóforo DFHBI, que interacciona con él de forma no covalente. La introducción de 2 átomos de flúor en el cromóforo de la GFP resultó en una gran disminución del  $pK_a$ , de forma que DFHBI prácticamente no muestra fluorescencia en

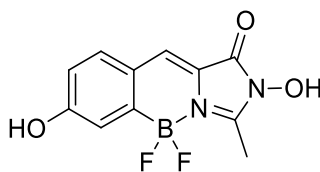
disolución, pero muestra una fuerte fluorescencia verde cuando forma un complejo con Spinach ( $\Phi_F = 72\%$ ).<sup>42,43</sup>



**Figura 2.17.** Estructura del cromóforo DFHBI.

#### - Sensores fluorescentes

Baleeva *et al.*<sup>44</sup> han llevado a cabo la síntesis de análogos con un grupo carbamato, susceptible de ser desprotegido liberando el grupo amino y modificando la fluorescencia. Por otro lado, Olsen *et al.*<sup>45</sup> han desarrollado fluoróforos sensibles al pH, mediante la introducción de un grupo  $\text{BF}_2$  y un hidroxilo adicional. Estos cromóforos no presentan fluorescencia a  $\text{pH} \geq 5$  por deprotonación del grupo N-OH.



**Figura 2.18.** Análogo sintetizado por Olsen *et al.*

Li *et al.* han desarrollado una sonda fluorescente para la detección de  $\text{Zn}^{2+}$  basada en un derivado de imidazolona unido a un resto de 1,10-fenantrolina por dos puntos de

<sup>42</sup> Paige, J. S.; Wu, K. Y.; Jaffrey, S. R. *Science* **2011**, 333, 642 – 646.

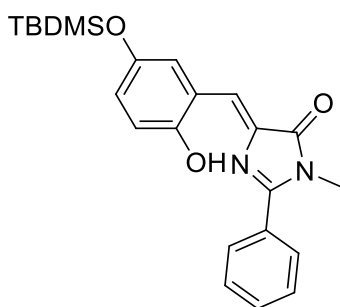
<sup>43</sup> Walker, C. L.; Lukyanov, K. A.; Yampolsky, I. V.; Mishin, A. S.; Bommarius, A. S.; Duraj-Thatte, A. M.; Azizi, B.; Tolbert, L. M.; Solntsev, K. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, 27, 64 – 74.

<sup>44</sup> Baleeva, N. S.; Yampolsky, I. V.; Baranov, M. S. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2016**, 42, 453 – 456.

<sup>45</sup> Olsen, S.; Baranov, M. S.; Baleeva, N. S.; Antonova, M. M.; Johnson, K. A.; Solntsev, K. M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, 18, 26703 – 26711.

unión.<sup>46</sup> Este quimiosensor experimenta un aumento de la fluorescencia de forma específica por unión al  $\text{Zn}^{2+}$  debido a la rotación restringida entre la 1,10-fenantrolina y los anillos de imidazolona.

El grupo de Long ha diseñado un quimiodosímetro fluorescente inspirado en el cromóforo de la GFP que exhibe una detección de  $\text{F}^-$  con alta selectividad y sensibilidad y está basado en la ruptura de enlaces silicio–oxígeno promovida por fluoruro.<sup>47</sup>



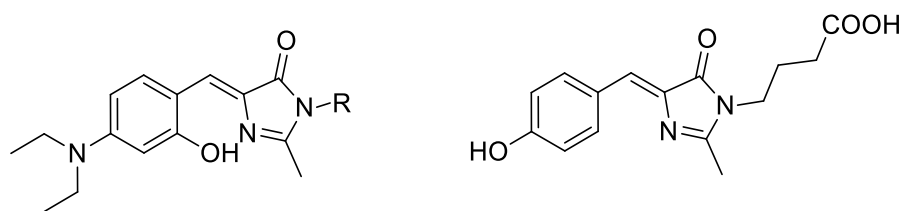
**Figura 2.19.** Quimiodosímetro de  $\text{F}^-$ .

#### - Visualización de proteínas

Las interacciones de algunos cromóforos con ciertas proteínas resultan en la activación de la fluorescencia de los mismos. El compuesto de la izquierda de la **Figura 2.20** muestra sensibilidad para la albúmina de suero humana, y no muestra fluorescencia en presencia de la bovina. Estudios recientes sugieren que varios receptores nucleares, (por ejemplo receptores alfa de estrógeno humano ( $\text{ER}\alpha$ )) pueden ser activados utilizando cromóforos sintéticos análogos al de la GFP, como el compuesto de la derecha de la **Figura 2.20**.<sup>43</sup>

<sup>46</sup> Li, Y.; Shi, L.; Quin, L.-X.; Qu, L.-L.; Jing, C.; Lan, M.; James, T. D.; Long, Y.-T. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 4361 – 4363.

<sup>47</sup> Liu, X.-Y.; Shi, L.; Ding, Z.; Long, Y.-T. *RSC Adv.* **2014**, 4, 53557 – 53560.

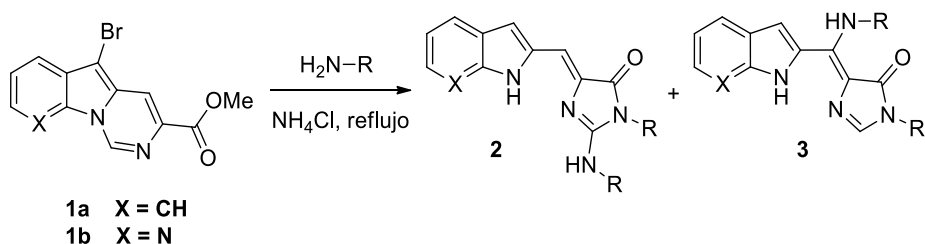


**Figura 2.20.** Izquierda, cromóforo análogo al de la GFP con sensibilidad a la HSA. Derecha, análogo activante de ER $\alpha$ .

## 2.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 2.2.1. INTRODUCCIÓN

Como ya se ha indicado en el capítulo de *Introducción y objetivos*, este capítulo está dedicado al diseño de una nueva estrategia sintética para la obtención de una familia de análogos del cromóforo de la GFP con un grupo amino incorporado en la posición C2 de la imidazolona, obtenidos inicialmente por la Dra. Morón en la reacción de los triciclos **1a** y **1b** con aminas primarias (**Esquema 2.2**).<sup>6</sup>



**Esquema 2.2.** Reacción de aminas primarias con los compuestos **1a/b**.

Los compuestos **2**, cuya analogía al cromóforo de la GFP es evidente, presentaron fluorescencia bajo radiación ultravioleta, lo que nos llevó a considerar el potencial interés de estos cromóforos con un sistema heteroaromático unido a un anillo de imidazolona a través de un puente metilénico.

En este capítulo se presenta una aproximación diferente a la obtención de análogos del cromóforo de la GFP. En nuestro caso exploramos una estrategia que implica la introducción de modificaciones en el anillo de imidazolona asumiendo que la presencia de un grupo amino en la posición C2 de la misma podría jugar un papel fundamental en la modulación de la fluorescencia, debido a la conjugación del sistema  $\pi$  del cromóforo con el par de electrones del nitrógeno del grupo amino.

Con el objetivo de obtener una serie de estos compuestos, se decidió abordar el diseño de una nueva ruta sintética para su obtención con la finalidad de mejorar su rendimiento y evitar su separación de **3**. Esta ruta sintética debía cumplir el requisito de flexibilidad para permitir introducir diversidad molecular a lo largo del proceso sintético. La modulación y mejora de la fluorescencia implica la introducción de

modificaciones estructurales en los distintos dominios de la molécula, por lo que se planteó la introducción de distintos heteroátomos en la posición C2 del anillo de imidazolona, así como la modificación del azol unido mediante un puente metilénico a la imidazolona. Una vez sintetizada la serie, se llevó a cabo un estudio de RMN para determinar la configuración *Z/E* del doble enlace exocíclico y la posible existencia de un puente de H intramolecular y los compuestos sintetizados se sometieron a diversos estudios fotoquímicos (espectros de absorción y emisión, rendimiento cuántico de fluorescencia, pruebas en distintos disolventes y a distintos pH), así como estudios biológicos de tinción celular

### 2.2.2. SÍNTESIS DE LOS CROMÓFOROS

#### 2.2.2.1. Diseño de una nueva ruta sintética

Como ya se ha comentado, la obtención de los compuestos **2** y otros análogos siguiendo el procedimiento sintético descrito en la Tesis de la Dra. Morón<sup>6</sup> no resulta adecuada, ya que este no fue diseñado para tal fin. Entre sus limitaciones, destacan el elevado número de pasos de síntesis —especialmente para **3a** (**Esquema 1.4**, página 9)—, la baja selectividad del último paso para la formación del compuesto deseado (se obtienen mezclas variables de ambos isómeros) y la dificultad para introducir diversidad estructural (los dos sustituyentes en el anillo de imidazolona deben ser idénticos y permite únicamente la obtención de compuestos con indol o azaindol como heterociclos aromáticos). La metodología a desarrollar tendría que intentar resolver estas limitaciones, especialmente posibilitar la introducción de diversidad estructural tanto en el resto heteroaromático como en la sustitución en el anillo de imidazolona.

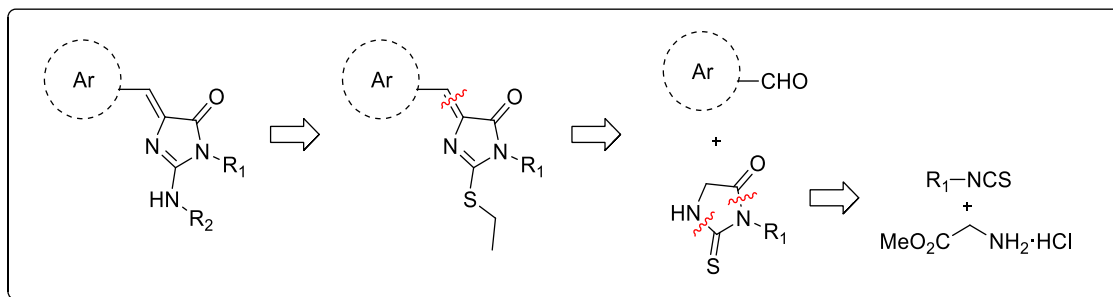
Después de evaluar distintas posibilidades para el diseño de una ruta sintética alternativa, decidimos utilizar una adaptación del procedimiento empleado por Renault *et al.*<sup>48</sup> para la preparación de compuestos que consideramos podrían ser intermedios adecuados para la obtención de nuestros objetivos sintéticos. Estos compuestos, las alquiltioimidazolonas, cuya estructura se detalla en el **Esquema 2.3**, podrían transformarse en las alquilaminoimidazolonas buscadas mediante un último paso de desplazamiento del grupo etilsulfanil por distintas aminas.

---

<sup>48</sup> Renault, S.; Bertrand, S.; Carreaux, F.; Bazureau, J. P. *J. Comb. Chem.* **2007**, 9, 935 – 942.



El esquema retrosintético se muestra a continuación:

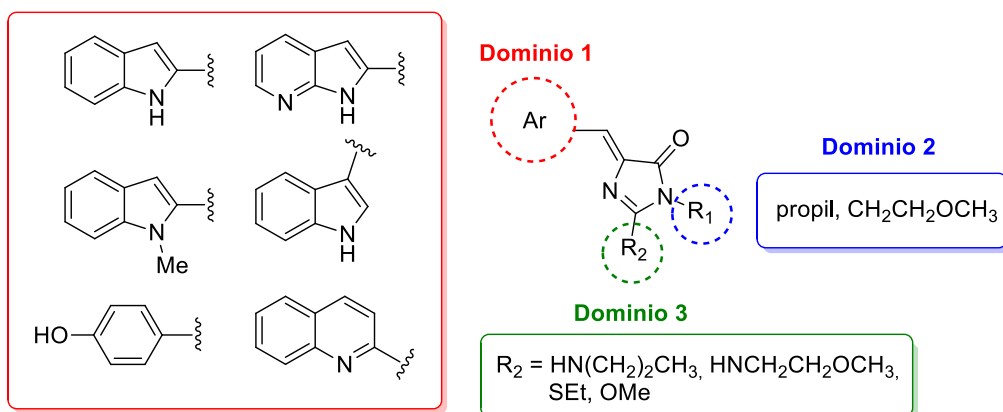


**Esquema 2.3.** Esquema retrosintético para la síntesis de **2** y análogos

La ruta sintética implicaría solo 3 pasos de reacción: a) una reacción multicomponente entre el isotiocianato portador de R<sub>1</sub> con clorhidrato de glicinato de metilo para formar la tiohidantoina; b) condensación de esta con el aldehído aromático (o heteroaromático) correspondiente; y c) reacción de la alquiltioimidazolona formada con aminas.

#### 2.2.2.2. Selección de las moléculas objetivo

Una vez diseñado el esquema retrosintético, se seleccionó el aldehído que habría que utilizar para preparar **2a** así como otros que permitieran comparar la influencia de la parte aromática en las propiedades de los compuestos obtenidos. Estas modificaciones se agrupan en lo que se denomina dominio 1 de la estructura general (**Figura 2.21**). Además, se establecieron otros 2 dominios adicionales.



**Figura 2.21.** Dominios establecidos para cromóforos análogos al de la GFP.

**Dominio 1.** La introducción de diversidad estructural se llevaría a cabo mediante la utilización de distintos restos arilo y heteroarilo.

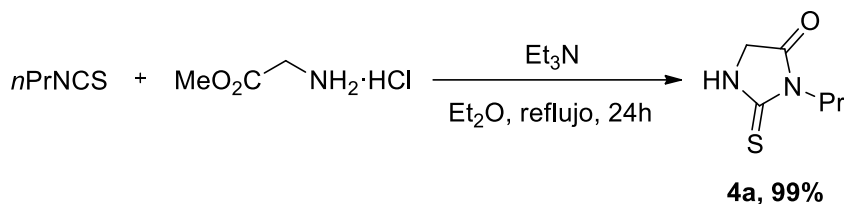
- Análogos con indol, azaindol y quinolina permitirían comparar la influencia de heterociclos  $\pi$ -deficientes y  $\pi$ -excedentes en las propiedades fluorescentes.
- *p*-Hidroxibenceno, por comparación con el *p*-HBDI, permitiría determinar la influencia del grupo amino en posición C2 del anillo de imidazolona en la fluorescencia.
- Indol unido a través de la posición C3 y *N*-metilindol unido a través de la posición C2 servirían para confirmar o descartar la posible existencia de un puente de hidrógeno intramolecular, así como la influencia en la fluorescencia de la sustitución del nitrógeno azólico.

**Dominio 2.** Se explorarían inicialmente dos sustituyentes distintos en el nitrógeno amídico de la imidazolona: los grupos propilo y 2-metoxietilo. El grupo 2-metoxietilo se introduciría para la síntesis de **2a** por esta nueva ruta sintética y el propilo para evaluar posibles variaciones en la solubilidad de los cromóforos.

**Dominio 3.** Se diseñó la introducción de distintos sustituyentes en la posición C2 del anillo de imidazolona: por un lado, distintas aminas para modular la solubilidad y, por el otro, sustituyentes etilsulfanil o metoxi, para comparar la influencia de distintos heteroátomos (N, O, S) en la fluorescencia.

### 2.2.2.3. Síntesis de los análogos del cromóforo de la GFP

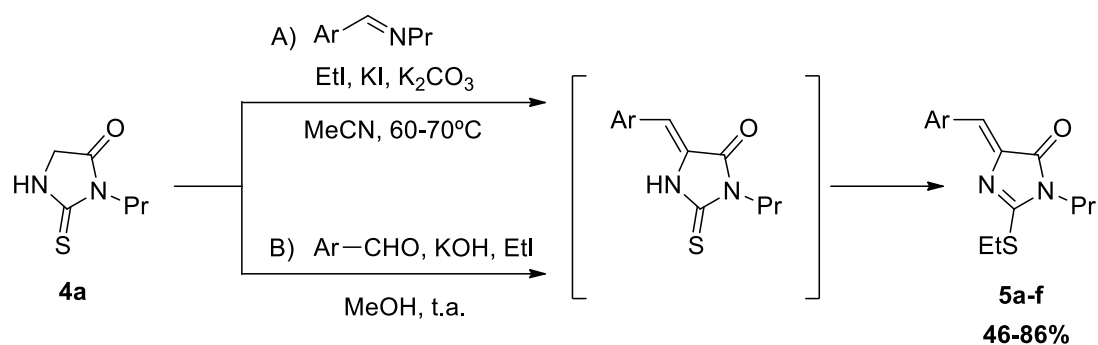
El primer paso de la ruta sintética es la síntesis de la tiohidantoína **4a**, obtenida de forma sencilla por adición de isotiocianato de propilo a hidrocloreto de glicinato de metilo en medio básico proporcionado por trietilamina y calentando a reflujo en dietiléter. De este modo se obtuvo con un rendimiento del 99%.



**Esquema 2.4.** Síntesis de la tiohidantoína **4a**.

El siguiente paso es la obtención de las imidazolonas **5a-f**. Estas se prepararon por dos métodos distintos que se recogen en el **Esquema 2.5**. En la mayoría de los casos se formó en primer lugar una aldimina generada por reacción del correspondiente aldehído aromático con *n*-propilamina en presencia de sulfato sódico anhidro. La posterior reacción de la aldimina con la tiohidantoína **4a** en medio básico, usando acetonitrilo como disolvente, condujo (método A) a los correspondientes productos de condensación esperados. En los casos en los que no se logró la obtención del producto de condensación utilizando estas condiciones de reacción o se obtuvo el producto con bajo rendimiento, se optó por un método alternativo consistente en hacer reaccionar la tiohidantoína directamente con el aldehído, en metanol a temperatura ambiente y usando hidróxido potásico como base (método B). En ambos casos se añadió yoduro de etilo a la mezcla de reacción para lograr la formación “*in situ*” de las 2-etilsulfanilimidazolonas **5a-f**. Hay que destacar que en todos los casos, e independiente del método utilizado, sólo se aisló uno de los dos posibles isómeros *Z/E* que podrían formarse, que resultó ser el que tiene la configuración *Z* como se pudo determinar por RMN (ver páginas 61-62).

## 2.2. Discusión de resultados

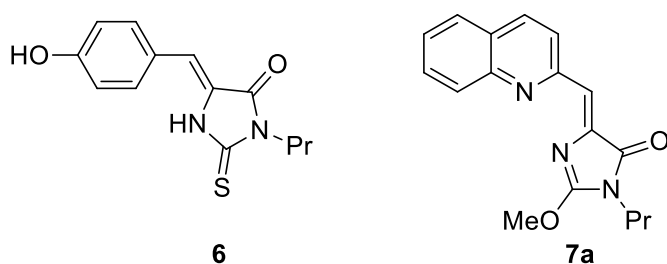


En la siguiente tabla se muestran los rendimientos de los compuestos **5a-f** así como el método utilizado para la síntesis de los mismos.

**Tabla 2.1.** Método de síntesis y rendimientos de los compuestos **5a-f**.

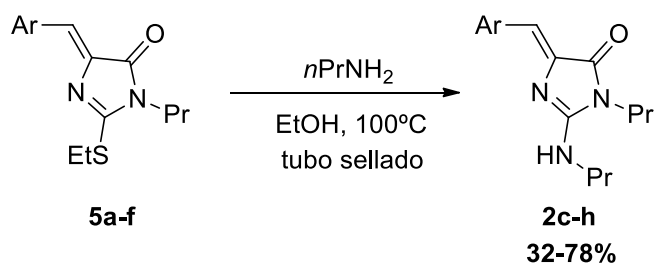
Entrada	Ar	Método	Rendimiento (%)	Compuesto
1		A	No determinado	<b>5a</b>
2		A	70	<b>5b</b>
3		A	46	<b>5c</b>
4		A	85	<b>5d</b>
5		B	86	<b>5e</b>
6		B	58	<b>5f</b>

En el caso del compuesto **5a**, se obtuvo una conversión completa del producto de partida, obteniéndose una mezcla 2:1 del producto **5a** junto al intermedio **6**, que no había reaccionado con el yoduro de etilo. Dado que ambos compuestos presentan un  $R_f$  muy similar, no se consiguió la separación de ambos productos por cromatografía, por lo que se decidió usar la mezcla 2:1 de ambos para el siguiente paso de reacción. En la síntesis del producto **5f**, se obtuvo como subproducto de la reacción el compuesto **7a** con un rendimiento del 38%. La formación de este se asume que se produce por sustitución del grupo etilsulfanil por parte del metanol, utilizado como disolvente en las condiciones básicas empleadas



**Figura 2.22.** Subproductos obtenidos en la síntesis de los compuestos **5a** y **5f**, respectivamente.

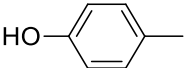
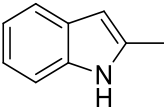
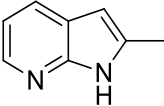
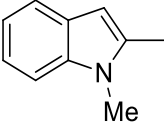
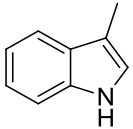
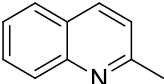
Finalmente, los intermedios **5a-f** se trataron con *n*-propilamina en etanol calentando a 100 °C en tubo sellado, dando lugar al desplazamiento del grupo etilsulfanil por la amina para formar las arilmetilidenimidazolonas **2c-h** con los rendimientos que se detallan en la **Tabla 2.2**.



**Esquema 2.6.** Síntesis de las arilmetilidenimidazolonas **2c-h**.

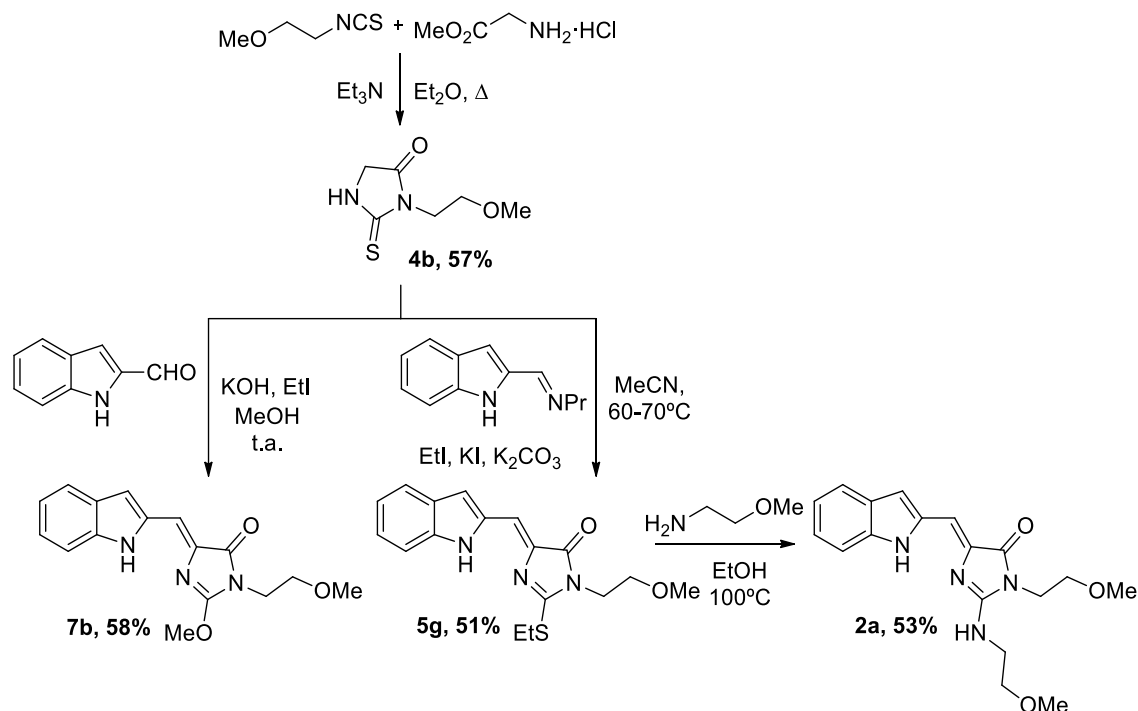
De este modo, mediante esta ruta sintética se consiguieron sintetizar las arilmetilenimidazolonas **2c-h** en 3 pasos de reacción con rendimientos globales entre buenos y medios. En la siguiente tabla se muestran los rendimientos de este último paso de reacción, así como los rendimientos globales.

**Tabla 2.2.** Rendimientos del último paso de reacción y globales para los productos **2c-h**.

Entrada	Ar	Rdto. último paso (%)	Rdto. global (3 pasos) (%)	Compuesto
<b>1</b>		74	74	<b>2c</b>
<b>2</b>		77	53	<b>2d</b>
<b>3</b>		71	32	<b>2e</b>
<b>4</b>		73	61	<b>2f</b>
<b>5</b>		32	27	<b>2g</b>
<b>6</b>		78	45	<b>2h</b>

Una vez sintetizado este primer grupo de análogos, se procedió a la síntesis de un segundo grupo manteniendo el indol como resto heteroarilo e introduciendo cierta diversidad estructural en los dominios 2 y 3. En esta serie, el grupo propilo  $R_1$  unido al N amídico de la imidazolona fue reemplazado por un grupo 2-metoxietilo.

La síntesis se llevó a cabo de forma análoga a la anterior, empleando en este caso isotiocianato de 2-metoxietilo. El esquema sintético se muestra a continuación.

Esquema 2.7. Síntesis de los compuestos **2a** y **7b**.

El compuesto **2a** se preparó fácilmente en 3 pasos de forma análoga al primer grupo de compuestos sintetizados. Partiendo de isotiocianato de 2-metoxietilo, tras sintetizar la tiohidantoína **4b** y formar el producto de condensación **5g**, se obtuvo **2a** por desplazamiento del grupo etilsulfanil con 2-metoxietilamina. Sobre la tiohidantoína **4b** también se llevó a cabo la reacción con indol-2-carboxaldehído utilizando el método B indicado anteriormente, obteniéndose en este caso el compuesto **7b** en el que el grupo etilsulfanil ha sido sustituido por un grupo metoxi, con un rendimiento del 58%. En este caso se obtiene este compuesto como producto principal, a diferencia de la síntesis de **5f**, en la cual el compuesto **7a** con el grupo metoxi se obtenía como producto minoritario.

Una vez sintetizada esta serie inicial de compuestos, se realizó un estudio de los cromóforos sintetizados, así como de algunos intermedios y del compuesto **2b** sintetizado previamente en el grupo.

### 2.2.3. ESTUDIO FOTOFÍSICO

El estudio fotofísico de los cromóforos sintetizados se llevó a cabo en el Departamento de Química de la Universidad de La Rioja por el grupo del Dr. Diego Sampedro.

#### 2.2.3.1. Espectroscopía UV

El estudio por espectroscopia UV implicó la obtención de los espectros UV de absorción y de emisión de los compuestos finales, así como del intermedio **5b** (para conocer el efecto del azufre) y el compuesto **2b** sintetizado previamente en el grupo.<sup>6</sup>

Las propiedades de luminiscencia fueron medidas usando disoluciones de concentración  $5 \cdot 10^{-5}$  M de cada compuesto en el disolvente de elección. Los espectros de excitación y emisión se obtuvieron usando un espectrofluorímetro y posteriormente se obtuvo el rendimiento cuántico de fluorescencia usando una esfera de integración a la longitud de onda de excitación de máxima emisión. Para comprobar la influencia del oxígeno en la fluorescencia de los compuestos, se tomó como referencia **2e** y se llevó a cabo la medida de su rendimiento cuántico de fluorescencia tanto en una disolución en cloroformo desoxigenado como en otra saturada con oxígeno. Ambas medidas dieron lugar a los mismos resultados, por lo que se concluyó que el oxígeno no tiene ningún efecto en la fluorescencia de estos compuestos.

En la **Tabla 2.3** se muestran los datos de longitud de onda máxima de absorción obtenidos tras irradiar los compuestos en un amplio espectro de longitudes de onda y observar dónde se encuentra el máximo de la curva, los datos de longitud de onda máxima de emisión al irradiar los compuestos con una luz de una longitud de onda cercana a su máximo de absorción y, finalmente, el rendimiento cuántico de fluorescencia calculado. Los datos de longitud de onda máxima de absorción y emisión, así como el rendimiento cuántico de fluorescencia se han calculado tanto en cloroformo como en agua.



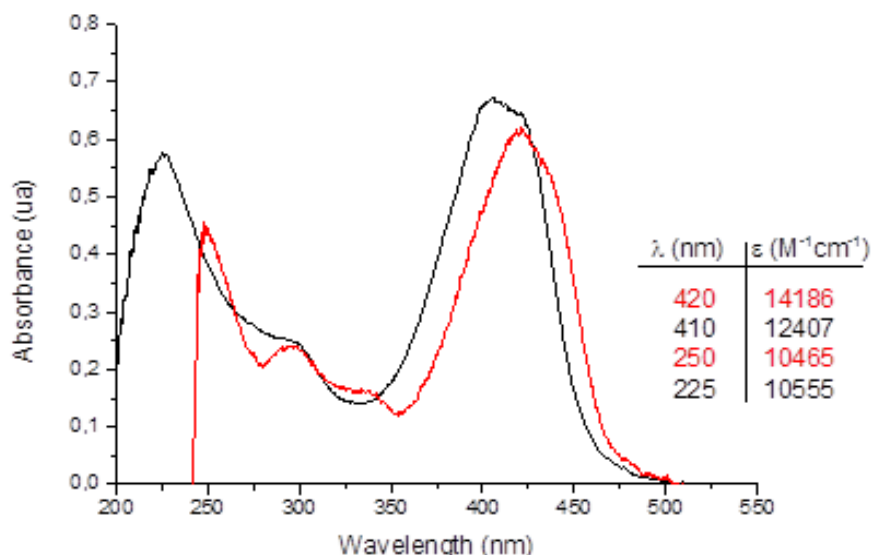
**Tabla 2.3.** Longitudes de onda máximas de absorción y emisión de los compuestos sintetizados en cloroformo y agua.

Entrada	Compuesto	CHCl <sub>3</sub> <sup>a,b</sup>			H <sub>2</sub> O <sup>a,b</sup>		
		$\lambda_{\text{abs}}$	$\lambda_{\text{em}}$	$\Phi_F$	$\lambda_{\text{abs}}$	$\lambda_{\text{em}}$	$\Phi_F$
1	2a	420	470	7.1	410	455	1.5
2	2b	420	465	42.5	410	470	3.1
3	2c	370	437	9.8	375	445	2.2
4	2d	420	460	8.3	415	490	2.7
5	2e	420	460	44.9	410	470	1.8
6	2f	420	467	10.6	415	470	0.9
7	2g	390	437	21.5	400	440	0.4
8	2h	395	435	12.6	390	470	< 0.1
9	5b	435	485	1.7	440	470	0.5
10	7b	410	450	7.9	395	450	1.9

<sup>a</sup>Longitudes de onda expresadas en nm. <sup>b</sup>Rendimientos cuánticos de fluorescencia  $\Phi_F$  expresados en %.

En cloroformo, se obtuvieron espectros UV de absorción muy similares para todos los compuestos observándose una fuerte banda de absorción ( $\epsilon \approx 15000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) entre 370 y 435 nm. Como se podría esperar, se encontró una absorción a energías menores para los compuestos más conjugados (derivados de indol y azaindol). En contraste, el efecto de los sustituyentes del anillo de imidazolona resultó ser pequeño.

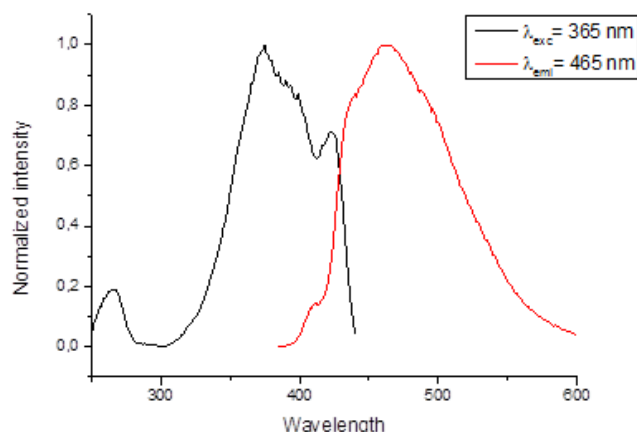
Los espectros de absorción en agua tienen características similares para todos los compuestos. En general, se observó un pequeño desplazamiento batocrómico al pasar de cloroformo a agua. Como ejemplo, se muestran a continuación los espectros superpuestos del derivado de azaindol **2e** en agua y cloroformo (**Figura 2.23**).



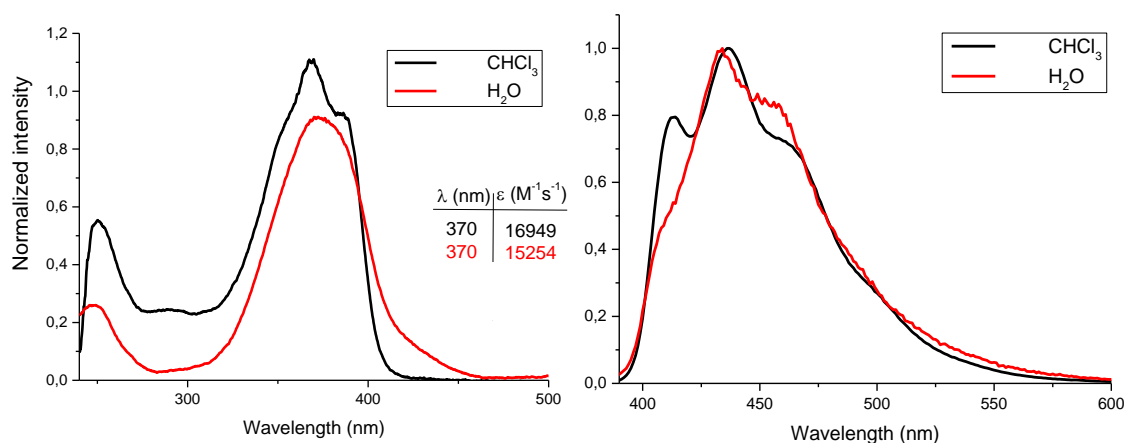
**Figura 2.23.** Espectro UV de **2e** en agua (línea negra) y cloroformo (línea roja).

Tanto en agua como en cloroformo, las longitudes máximas de emisión se encuentran entre 435 y 490 nm, pero se encontraron diferencias significativas en los rendimientos cuánticos de fluorescencia, dependiendo principalmente del resto arilo unido mediante el puente metilénico al anillo de imidazolona. Los mejores resultados se obtuvieron para los compuestos en los que el resto arilo es un grupo azaindol, obteniéndose rendimientos cuánticos de fluorescencia elevados en cloroformo (**2e**, 44.9% y **2b**, 42.5%).

A continuación se muestran los espectros de absorción y emisión superpuestos del derivado de azaindol **2e** en cloroformo (**Figura 2.24**) y los espectros de absorción y emisión en agua y cloroformo del derivado de *para*-hidroxibenceno **2c** (**Figura 2.25**). Se puede observar que para **2c** tanto en absorción como en emisión los espectros en ambos disolventes son muy similares.



**Figura 2.24.** Espectro UV de excitación y emisión de **2e** en cloroformo (línea negra, excitación  $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ ; línea roja, emisión  $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$ ).



**Figura 2.25.** Espectros UV de absorción (izquierda) y emisión (derecha) de **2c** en agua y cloroformo (línea roja en agua, línea negra en cloroformo).

En contraste, los rendimientos cuánticos determinados para los derivados de indol y quinolina fueron claramente inferiores –en cloroformo: **2g** (21.5%); **2h** (12.6%).

Se pudo encontrar cierta influencia de los sustituyentes del anillo de imidazolona en la fluorescencia. Así, si se comparan los compuestos **2d**, **7b** y **5b** con grupos amino ( $\Phi_F = 8.3\%$ ), etilsulfanil ( $\Phi_F = 1.7\%$ ) y metoxilo ( $\Phi_F = 7.9\%$ ), como sustituyentes se

observa un aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia para **2d** lo que puede ser atribuido al mayor aporte de densidad electrónica al cromóforo por parte el grupo amino.

A pesar de los altos rendimientos cuánticos de fluorescencia obtenidos para algunos de los compuestos en disolventes orgánicos, el uso de los mismos es incompatible en aplicaciones biológicas. Por ello, decidimos extender el estudio de las propiedades fotofísicas a soluciones acuosas, analizando los efectos del pH, así como el uso de disolventes alternativos.

En términos generales, al comparar los resultados de absorción, emisión y rendimiento cuántico en agua y cloroformo, se pudo observar que las longitudes de onda de absorción y de emisión sólo resultaron afectadas levemente por el cambio en el disolvente. Sin embargo, los rendimientos cuánticos de fluorescencia son claramente inferiores en agua. Este efecto ha sido previamente observado en distintos derivados del cromóforo de la proteína verde fluorescente,<sup>49</sup> y es congruente con lo esperado, ya que los disolventes próticos contribuyen a una desactivación por vías no radiantes más eficiente. No obstante, cabe señalar que algunos de los compuestos obtenidos mantienen la fluorescencia en disoluciones acuosas (**2c**:  $\Phi_F = 2.2\%$ ; **2e**:  $\Phi_F = 1.8\%$ ; **2b**:  $\Phi_F = 3.1\%$ ). En contraste, el cromóforo de la GFP no muestra fluorescencia fuera del entorno de la proteína. De hecho, estos 3 compuestos tienen unos rendimientos cuánticos de fluorescencia en agua 2 órdenes de magnitud superiores al *p*-HBDI ( $\Phi_F = 0.02\%$ ), lo que demuestra que el grupo amino en posición C2 del anillo de imidazolona está contribuyendo de forma significativa al aumento de la fluorescencia en este tipo de análogos de la GFP.

Posteriormente, se evaluó la emisión de los derivados de azaindol **2e** y **2b** en distintos disolventes para explorar mejor el efecto del disolvente en la fluorescencia, encontrándose una tendencia similar para ambos compuestos. Para el compuesto **2e**, el derivado de azaindol con un grupo propilo en el nitrógeno amídico de la imidazolona, el rendimiento cuántico de fluorescencia ( $\Phi_F$ ) en agua es 1.8%, y aumenta al disminuir la polaridad del disolvente, siendo de un 13.2% en metanol, 20.9% en DMSO y 44.9% en cloroformo. De forma similar, para el derivado de azaindol con un grupo 2-metoxietilo

---

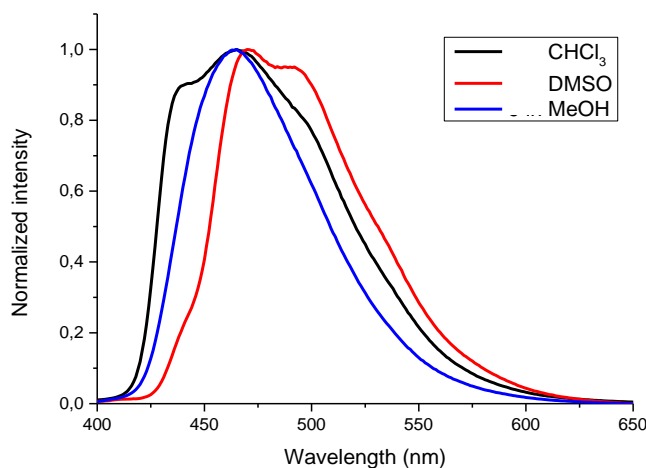
<sup>49</sup> Yang, J.-S.; Huang, G.-J.; Liu, Y.-H.; Peng, S.-M. *Chem. Commun.* **2008**, 1344 – 1346.

**2b** se obtuvieron rendimientos cuánticos de fluorescencia de 3.1%, 10.6%, 22.4% y 42.5% en agua, metanol, DMSO y cloroformo respectivamente.

**Tabla 2.4.** Rendimientos cuánticos de fluorescencia para los compuestos **2e** y **2b** en distintos disolventes.

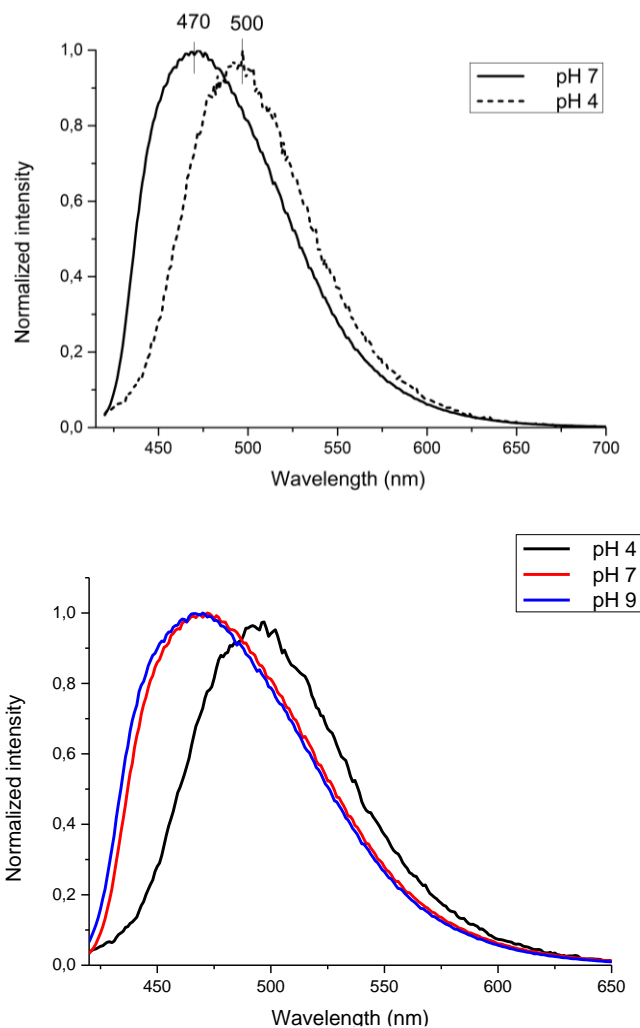
Compuesto	$\Phi_F$ (%)			
	H <sub>2</sub> O	MeOH	DMSO	CHCl <sub>3</sub>
<b>2e</b>	1.8	13.2	20.9	44.9
<b>2b</b>	3.1	10.6	22.4	42.5

En la **Figura 2.26** se muestra el espectro de emisión de **2b** en distintos disolventes. Se puede observar que, aunque el espectro muestre ciertos desplazamientos dependiendo del disolvente, el máximo de emisión se sitúa prácticamente a la misma longitud de onda independientemente del disolvente utilizado. Además de la polaridad, otros efectos del propio disolvente, como la capacidad de cada disolvente de formación de puentes de hidrógeno, ejercen cierta influencia en la fluorescencia.



**Figura 2.26.** Espectro UV de emisión de **2b** en distintos disolventes (CHCl<sub>3</sub> en línea negra, DMSO en roja y MeOH en azul).

También se exploró el efecto del pH en las propiedades de emisión, ya que un distinto comportamiento de fluorescencia de los compuestos dependiendo del pH podría ser relevante para aplicaciones biológicas de estos compuestos como sondas en distintas condiciones de acidez o basicidad. Para ello se seleccionaron los compuestos con mejores rendimientos cuánticos de fluorescencia (**2e** y **2b**) y con ellos se realizó un estudio de emisión a distintos pH (**Figura 2.27**).



**Figura 2.27.** Arriba, espectro UV de emisión de **2e** en H<sub>2</sub>O a pH=7 (línea sólida) y a pH=4 (línea discontinua). Abajo, espectro UV de emisión de **2b** en H<sub>2</sub>O a pH 4, 7 y 9 (líneas negra, roja y azul, respectivamente).

En ambos casos se observó un desplazamiento batocrómico de 30 nm en la longitud de onda de emisión (de 470 nm a 500 nm) en disoluciones acuosas ácidas (pH=4). El rendimiento cuántico de fluorescencia aumentó del 1.8% en disoluciones acuosas neutras al 3.9% en disoluciones ácidas para **2e** y del 3.1% al 5.5% para **2b**. Esta diferencia en la longitud de onda de emisión podría ser útil en aplicaciones biológicas, dado que se podrían observar distintos colores en entornos neutros y ácidos.

### 2.2.3.2. Estudio computacional

En un esfuerzo por racionalizar estos resultados, el grupo del Dr. Diego Sampedro de la Universidad de La Rioja llevó a cabo una serie de cálculos teóricos mecanocuánticos que requieren la aplicación de la teoría funcional de densidad dependiente del tiempo TD-DFT (*Time Dependent-Density Functional Theory*) para estudiar la fotofísica de los compuestos utilizando varios funcionales. Para ello, se utilizaron el funcional híbrido de intercambio de 3 parámetros de Becke<sup>50</sup> con el funcional de correlación de Lee–Yang–Parr<sup>51</sup> incluyendo el método de atenuación de Coulomb<sup>52</sup> (CAM-B3LYP) y el híbrido funcional M06-2X de Zhao y Truhlar.<sup>53</sup> Se llevaron a cabo cálculos TD-DFT con 20 estados para determinar las energías de excitación vertical y los parámetros de fuerza del oscilador  $f$ , por ejemplo, el espectro de absorción). Se incluyeron los efectos del disolvente en los espectros UV usando el modelo continuo polarizable (PCM)<sup>54</sup> con agua como disolvente. Todos los cálculos TD-DFT se llevaron a cabo con el software Gaussian 09.<sup>55</sup>

Para este estudio, se seleccionaron los compuestos **2c**, **2d** y **2e** como ejemplos representativos de las modificaciones en el resto arilo, así como **2a** para evaluar el efecto de los sustituyentes en la aminoimidazolona. Los resultados se muestran en la **Tabla 2.5**.

<sup>50</sup> Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 1372 – 1377.

<sup>51</sup> Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785 – 789.

<sup>52</sup> Yanai, T.; Tew, D. P.; Handy, N. C. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *393*, 51 – 57.

<sup>53</sup> Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215 – 241.

<sup>54</sup> Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999 – 3094.

<sup>55</sup> Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B. *et al.* Gaussian 09, Revision D.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, **2009**.

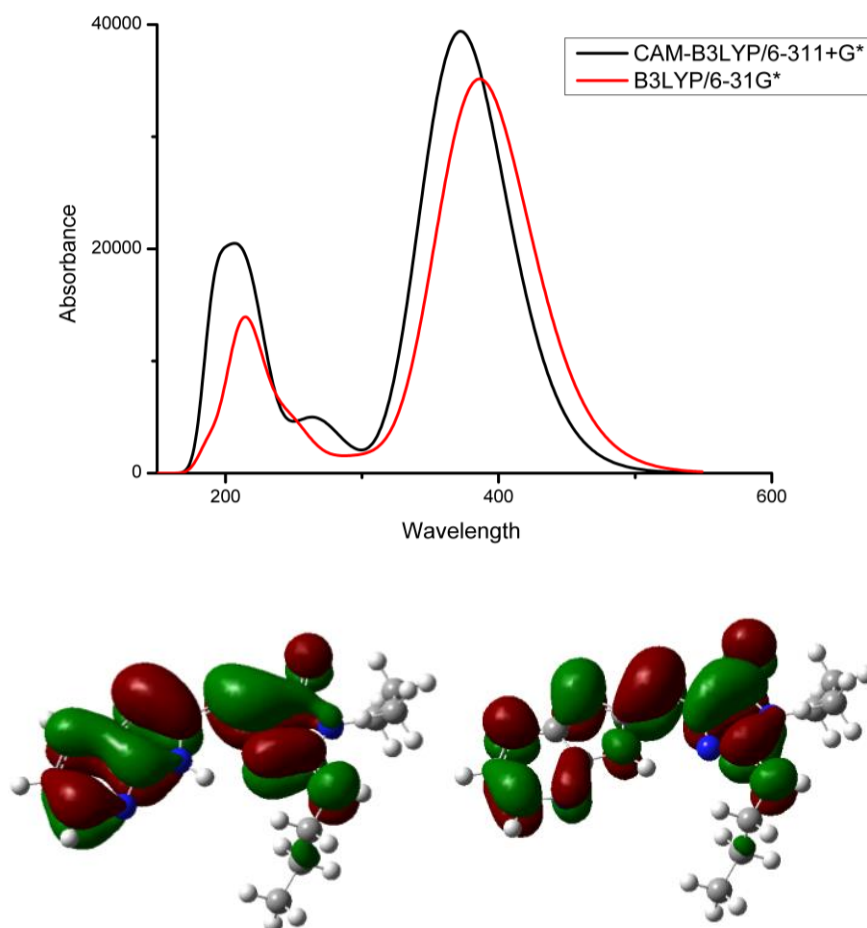
**Tabla 2.5.** Valores obtenidos del cálculo computacional de longitud de onda máxima de absorción y emisión en nanómetros y de fuerza del oscilador  $f$ . El set de bases estándar utilizado es 6-31G\* a no ser que se especifique uno distinto. En todos los casos se utilizó agua en los cálculos PCM.

Entrada	Compuesto	Método	$\lambda_{\text{abs}}$	$f$	$\lambda_{\text{em}}$
1	<b>2c</b>	B3LYP	355	0.71	403
2		CAM-B3LYP	323	0.76	380
3		CAM-B3LYP-PCM	338	0.83	409
4		M06-2X-PCM	338	0.83	408
5		CAM-B3LYP-PCM/6-311+G	346	0.80	425
6	<b>2d</b>	B3LYP	389	0.75	434
7		CAM-B3LYP	349	0.93	404
8		CAM-B3LYP-PCM	362	0.99	438
9		M06-2X-PCM	361	0.98	436
10		CAM-B3LYP-PCM/6-311+G	371	0.99	456
11	<b>2e</b>	B3LYP	387	0.86	430
12		CAM-B3LYP	349	0.92	407
13		CAM-B3LYP-PCM	363	0.98	442
14		M06-2X-PCM	362	0.97	440
15		CAM-B3LYP-PCM/6-311+G	372	0.97	459
16	<b>2a</b>	B3LYP	390	0.74	440
17		CAM-B3LYP	350	0.94	404
18		CAM-B3LYP-PCM	362	1.00	438
19		M06-2X-PCM	361	0.99	435
20		CAM-B3LYP-PCM/6-311+G	371	1.00	456

Los espectros UV computerizados de los compuestos **2c**, **2d**, **2e** y **2a** muestran los mismos rasgos que los espectros experimentales. En todos los casos se observa una



fuerte absorción (valores de fuerza del oscilador  $f = 0.7\text{--}1.0$ ) en el rango de 320-390 nm, y la transición en todos se produce entre el orbital HOMO con carácter  $\pi$  y el orbital LUMO  $\pi^*$ .



**Figura 2.28.** Arriba, espectro UV computerizado en los niveles CAM-B3LYP/6-311+G\* (PCM, línea negra) y B3LYP (línea roja). Orbitales de transición HOMO abajo, a la izquierda y LUMO abajo, a la derecha.

En general, se observa una buena concordancia cualitativa entre los datos experimentales y los computacionales. Aunque los distintos modelos químicos teóricos reproducen de forma cualitativa las intensidades de las principales bandas de absorción, la pequeña banda aproximadamente a 280 nm no ha sido encontrada a los niveles más

bajos en cálculos teóricos. Además, en el espectro teórico se ha encontrado un aumento consistente a energías más elevadas.

Se pueden observar varias tendencias a partir de los datos en la **Tabla 2.5**. En primer lugar, los niveles más bajos de cálculo con los set de bases de los funcionales B3LYP y 6-31G\* sin la inclusión del disolvente a través de PCM podrían ser bastante útiles para un screening preliminar rápido de posibles modificaciones sintéticas en los cromóforos, ya que muestra una concordancia razonable con los datos experimentales, especialmente para la absorción.<sup>56</sup> En segundo lugar, el uso de otros funcionales como CAM-B3LYP o M06-2X no tiene un marcado impacto en la calidad de los resultados, pero aumenta el coste computacional. En tercer lugar, el uso de PCM y un set de bases mayor, permite una mejor concordancia con los datos experimentales en el caso de la longitud de onda máxima de emisión, pero no para la absorción.

### 2.2.4. ESTUDIOS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

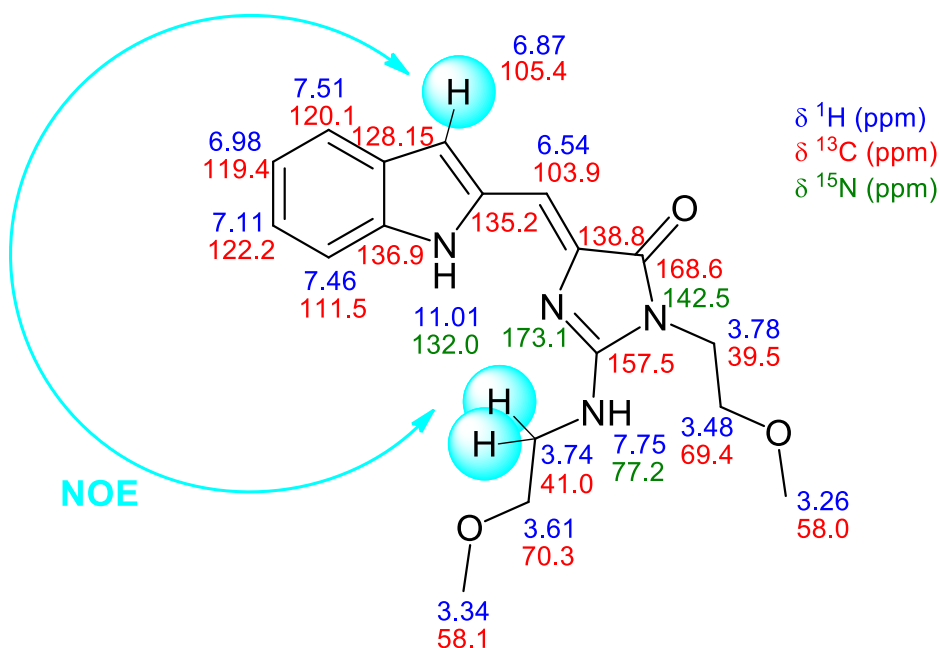
Los estudios de Resonancia Magnética Nuclear fueron realizados por el Dr. Antonio Salgado, responsable del servicio de RMN de la Universidad de Alcalá.

#### 2.2.4.1. Determinación estructural del compuesto **2a** (isómero *Z*)

Para poder determinar la configuración de los análogos sintetizados (*E* o *Z*), se llevó a cabo la determinación estructural del compuesto **2a** como ejemplo representativo, utilizando para ello un espectrómetro Bruker Avance 700 MHz a temperatura ambiente. Se logró asignar los desplazamientos para <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y <sup>15</sup>N gracias a los experimentos 1D y 2D (COSY, HSQC y HMBC) llevados a cabo.

---

<sup>56</sup> Charaf-Eddin, A.; Planchat, A.; Mennucci, B.; Adamo, C.; Jacquemin, D. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, 9, 2749 – 2760.



**Figura 2.29.** Desplazamientos en ppm de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ -RMN del compuesto **2a** (700 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ).

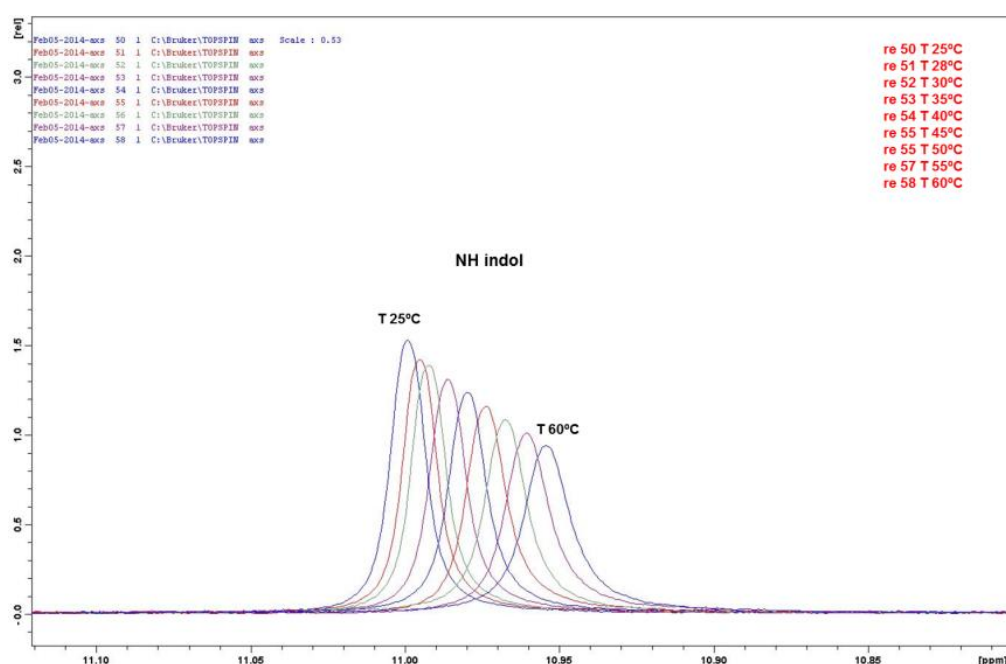
La configuración del doble enlace se determinó mediante experimentos NOE. La interacción NOE entre la señal a 3.74 ppm (H en el carbono contiguo al nitrógeno del grupo amino en posición 2 del anillo de imidazolona,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ) y la señal a 6.87 ppm (correspondiente al H en el C3 del indol) sólo es compatible con la olefina Z, en una conformación en la cual el H3 del indol es *syn* respecto al anillo de imidazolona. Estos resultados concuerdan con los encontrados en bibliografía para análogos del cromóforo de la GFP, en los cuales el doble enlace tiene configuración Z.

#### 2.2.4.2. Determinación del coeficiente de variación del desplazamiento químico del NH indólico con la temperatura.

Con el objetivo de reunir información acerca de la hipotética formación de un puente de hidrógeno entre el NH indólico en los compuestos **2a**, **2b**, **2d** y **2e** y el nitrógeno imínico de la imidazolona, se seleccionó como modelo el compuesto **2a** y se decidió determinar el coeficiente de variación del desplazamiento químico con la temperatura ( $\Delta\delta/\Delta T$ ) del NH.

## 2.2. Discusión de resultados

Generalmente se acepta, especialmente para enlaces peptídicos de amida, que bajos coeficientes de variación del desplazamiento químico con la temperatura están relacionados con una baja accesibilidad del disolvente hacia el H de la amida, y de esa forma suponen una fuerte evidencia de la existencia de puentes de H intramoleculares.<sup>57</sup> Los desplazamientos químicos de protones de amidas peptídicas que son más accesibles a las moléculas de disolvente son mucho más sensibles a las variaciones de temperatura, por lo que muestran coeficientes de temperatura mayores. En este caso, se realizó una monitorización del desplazamiento químico del NH indólico en DMSO-*d*<sub>6</sub> a distintas temperaturas. A continuación se muestran los espectros obtenidos superpuestos, expandidos en la zona del NH indólico.



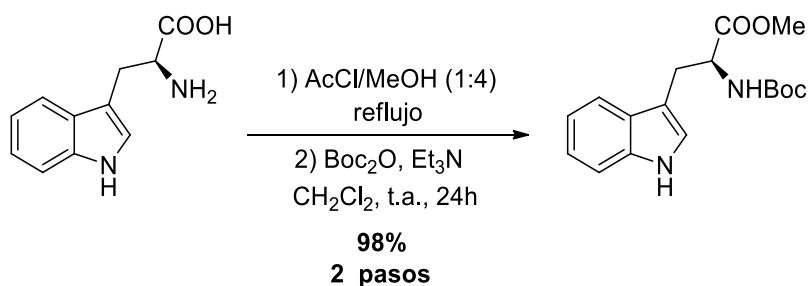
**Figura 2.30.** Desplazamiento químico del NH del indol de **2a** en DMSO-*d*<sub>6</sub> a distintas temperaturas.

Se determinó el coeficiente de temperatura para el NH indólico del compuesto **2a**, de -1.4 ppb/°C entre 25-60 °C. La pequeña magnitud de este coeficiente sugiere que, *a priori*, mayoritariamente sólo se formarían puentes de H intramoleculares.

<sup>57</sup> Contreras, M. A.; Haack, T.; Royo, M.; Giralt, E.; Pons, M. *Lett. Pept. Sci.* **1997**, 4, 29 – 39.

Para corroborar estos resultados, se decidió realizar el mismo experimento de temperatura variable a otro compuesto cuyo NH no pueda formar puentes de H intramoleculares, y comparar los resultados obtenidos para el compuesto **2a** con los del compuesto control.

Inicialmente se pensó en utilizar el L-Triptófano como molécula control, pero tras realizar una prueba de solubilidad del mismo en DMSO, se comprobó que no era soluble en este disolvente. Por ello, se realizó la esterificación del ácido, usando una mezcla AcCl/MeOH 1:4, y la protección del grupo amino en forma de *tert*-butoxicarbonil derivado, por reacción con Boc<sub>2</sub>O en medio básico, para obtener un derivado de este aminoácido más soluble en DMSO.<sup>58</sup>

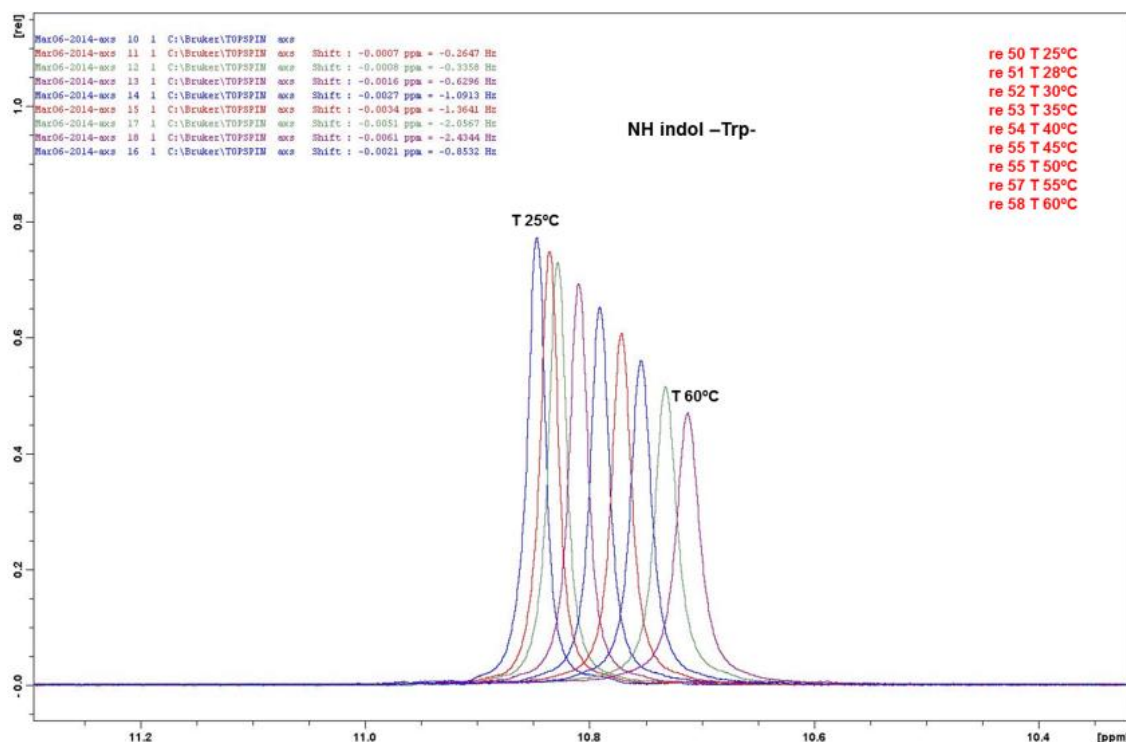


**Esquema 2.8.** Síntesis del éster metílico de L-triptofano protegido con Boc.

Tras comprobar la solubilidad del éster metílico de L-triptofano protegido con Boc en DMSO, se realizó la determinación de su coeficiente de temperatura. A continuación se muestran los espectros obtenidos superpuestos, expandidos en la zona del NH indólico.

<sup>58</sup> Zhang, Y.; Yang, P.; Chou, C. J.; Liu, C.; Wang, X.; Xu, W. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, 4, 235 – 238.

## 2.2. Discusión de resultados



**Figura 2.31.** Desplazamiento químico del NH del indol del éster metílico de L-triptofano protegido con Boc en DMSO- $d_6$  a distintas temperaturas.

El coeficiente de temperatura del NH indólico del éster metílico de L-triptofano protegido con Boc resultó ser de -3.7 ppb/°C entre 25-60 °C. Este coeficiente es mayor (en valor absoluto) que el del compuesto **2a**, lo que permitiría concluir en la no existencia de puentes de H intramoleculares en el compuesto **2a**. Por ello, la pequeña dependencia del desplazamiento químico con la temperatura observada para **2a** puede racionalizarse con la existencia de ciertas interacciones transitorias lábiles entre el NH y moléculas del disolvente (DMSO).

### 2.2.5. ESTUDIOS DE TINCIÓN CELULAR

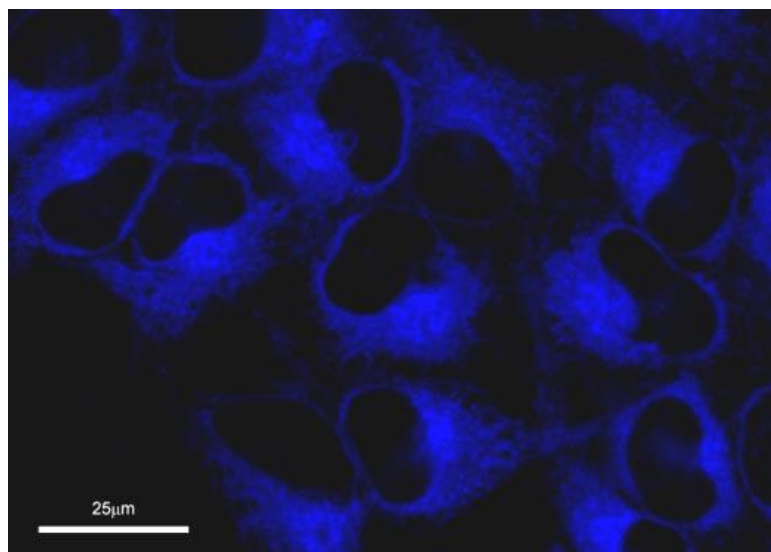
Al comprobarse que los fluoróforos sintetizados presentan buena solubilidad en agua y un rendimiento cuántico de fluorescencia aceptable en este medio, se realizaron ensayos de tinción celular. Para ello, se tomaron como compuestos modelo los análogos **2c** (derivado de *para*-hidroxifenilo) y **2e** (derivado de azaindol). El compuesto **2c** se eligió debido a que es el compuesto más parecido al cromóforo de la GFP, y sólo se diferencia del mismo en el nitrógeno unido a la posición C2 del anillo de imidazolona, por lo que resultaba de interés comprobar si, además de rendimientos cuánticos de fluorescencia superiores al *p*-HBDI, podía tener aplicaciones biológicas. El compuesto **2e**, por su parte, se eligió debido a que presenta el valor más elevado de rendimiento cuántico de fluorescencia en cloroformo.

Los ensayos de tinción celular fueron llevados a cabo en nuestro grupo por el Dr. Alberto Domingo.

La capacidad de entrada y la distribución intracelular se estudió para ambos compuestos mediante microscopía confocal. Se emplearon células HeLa cultivadas sobre cubreobjetos en Dulbecco's Modified Eagle's Medium suplementado con un 10% de suero fetal bovino (DMEM, 10% FBS). Los compuestos se disolvieron en DMSO y se diluyeron mil veces en medio de cultivo, quedando el DMSO a una concentración final de 0.1% no tóxica para las células.

Aunque en este estudio el compuesto **2c** no presentó ninguna tinción fluorescente detectable, el análisis mostró una marcada capacidad del compuesto **2e** para penetrar en células vivas y acumularse aparentemente en el retículo endoplásmico.

La absorción de **2e** por las células es rápida. La localización intracelular es claramente visible tras 15 min de exposición (**Figura 2.32**). Tiempos más largos de incubación, hasta 24 h, muestran el mismo patrón, sin evidencia de acumulación intracelular progresiva o alteración visible de la morfología celular, lo que sugiere que este compuesto presenta una citotoxicidad reducida.



**Figura 2.32.** Cultivo celular de células HeLa tras 15 min de exposición al compuesto **2e**, en una concentración de 5  $\mu\text{M}$  en el medio de cultivo. Imágenes de microscopía confocal tomadas con un láser de diodo UV, excitación a 405 nm, filtro de emisión de 412–485 nm.

La distribución de fluorescencia intracelular es totalmente compatible con una localización del compuesto en el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi, sugiriendo una absorción por algún mecanismo activo de endocitosis más que por difusión pasiva a través de la membrana celular. La fluorescencia está totalmente excluida del citosol y del interior del núcleo celular, mientras que la envuelta celular está bien delineada, como cabría esperar de su continuidad con el retículo endoplásmico. La exclusión del nucleoplasma también indica que el compuesto se encuentra confinado en vesículas membranosas y orgánulos y que no difunde libremente en el citoplasma. La intensidad de la fluorescencia parece ser suave y es compatible con una molécula soluble confinada al lumen del RE y aparato de Golgi. Otros ajustes de excitación y emisión llevados a cabo a longitudes de onda mayores no mostraron ninguna fluorescencia detectable. Las células de control que no fueron expuestas al compuesto **2e** no mostraron ninguna fluorescencia bajo las mismas condiciones.



En conclusión, se ha diseñado una ruta sintética eficaz para la obtención de una nueva familia de cromóforos análogos al de la GFP, y se ha estudiado su comportamiento fotofísico. Algunos de los compuestos sintetizados han mostrado características interesantes, como el compuesto **2c** con un rendimiento cuántico de fluorescencia mejorado en 2 órdenes de magnitud respecto a su análogo *p*-HBDI, o el **2e**, con un rendimiento cuántico de fluorescencia en cloroformo del 44.9%. Este último compuesto, además, ha mostrado propiedades prometedoras en tinción celular, con una alta selectividad por el retículo endoplásmico.



### **3. Síntesis de una familia de inhibidores de calpaínas**

#### **3.1. Antecedentes**

3.1.1. Introducción

3.1.2. Calpaínas

3.1.3. Inhibidores de calpaínas

#### **3.2. Discusión de resultados**

3.2.1. Diseño de una ruta sintética alternativa

3.2.2. Síntesis de análogos de 3a

3.2.2. Ensayos de inhibición



## 3.1. ANTECEDENTES

### 3.1.1. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) es uno de los problemas de salud más extendidos a nivel mundial, siendo la diabetes mellitus la causa más frecuente de ERC en los países desarrollados. La Federación Internacional de Diabetes (*IDF*) estima que 1 de cada 11 adultos padecen esta enfermedad, y se prevé que en 2040 el porcentaje suba hasta el 10%.<sup>59</sup> En Europa la diabetes afecta a unos 60 millones de personas, incluyendo unos 23 millones de casos no diagnosticados, y produce unas 600 mil muertes al año.<sup>60</sup> La edad es un factor de riesgo en la diabetes tipo 2, y en Europa un 30.8% de la población entre 50 y 79 años padece diabetes (estudio realizado en 2015), estimándose un aumento hasta un 35.6% en 2040.<sup>60</sup> En España esta enfermedad afecta a un 13.8% de la población adulta, lo que supone más de 5 millones de personas.<sup>61</sup>

Desde el año 2007, nuestro grupo de investigación forma parte de la Red de Investigación Renal (REDINREN, [www.redinren.org](http://www.redinren.org)), una Red Temática de Investigación Cooperativa financiada por el Instituto de Salud Carlos III. La RED promueve la cooperación entre grupos de investigación básica y clínica destacados en el ámbito de la enfermedad renal, que desarrollan investigaciones punteras en distintas áreas, entre otras en la identificación de dianas que puedan estar implicadas en la aparición y progreso de la ERC y el estudio de las mismas. Dentro de la RED, nuestro grupo fue seleccionado como grupo de Química Médica para abordar el diseño y la síntesis de nuevas moléculas bioactivas frente a estas dianas.

Entre las dianas terapéuticas estudiadas por la RED, se encuentran las calpaínas. En este capítulo se detallan nuestros estudios orientados a la búsqueda de nuevos inhibidores no peptídicos de estas proteasas.

---

<sup>59</sup> Atlas de la diabetes. <http://www.idf.org/idf-diabetes-atlas-seventh-edition>.

<sup>60</sup> Datos del año 2015, Federación Internacional de Diabetes (IDF).

<sup>61</sup> Datos del año 2015, Federación de Diabéticos Españoles (FEDE).

#### 3.1.2. CALPAÍNAS

##### 3.1.2.1. Definición

Las calpaínas constituyen una gran familia de cisteín proteasas neutras intracelulares dependientes del calcio para su actividad. Utilizan la escisión de algunos de sus dominios<sup>62</sup> para modificar la actividad de sus proteínas sustrato,<sup>63</sup> actuando como un mecanismo regulatorio postraducciona irreversible.

Su descubrimiento se remonta a 1964,<sup>64</sup> cuando Guroff logró aislar una proteasa neutra dependiente de calcio en una fracción soluble del cerebro de rata. Esta enzima fue purificada por Ishiura *et al.*<sup>65</sup> en 1978, quienes la denominaron proteasa neutra activada por  $\text{Ca}^{2+}$ . Posteriormente, se le dio el nombre de calpaína, combinando los nombres de dos proteasas conocidas en el momento, **cal-**, por la calmodulina (proteína intracelular reguladora en la transducción de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ ), y **-paína**, por la papaína (cisteín proteasa presente en la papaya).

Estas enzimas están involucradas en una gran variedad de procesos celulares regulados por calcio, entre los que destacan la modulación de la señal de transducción en proteínas, la proliferación y la diferenciación celular, la apoptosis, la activación de plaquetas y la fusión de membranas.<sup>66,67</sup> La participación de las calpaínas en esta amplia variedad de funciones fisiológicas determina el papel relevante de las mismas en diversas enfermedades, tales como desórdenes neurológicos, isquemia, distrofia muscular, cáncer, cataratas, diabetes, etc.<sup>68</sup>

---

<sup>62</sup> **Dominio:** segmento proteico que forma una unidad compacta, estructuralmente independiente, y posee una función específica (p.e. la unión a un ión o molécula pequeña).

<sup>63</sup> Baudry, M.; Bi, X. *Trends Neurosci.* **2016**, 39, 235 – 245.

<sup>64</sup> Guroff, G. *J. Biol. Chem.* **1964**, 239, 149 – 155.

<sup>65</sup> Ishiura, S.; Murofushi, H.; Hatanaka, M.; Murakami, T. *Adv. Enzyme Regul.* **1981**, 407 – 424.

<sup>66</sup> (a) Low, K. E.; Ler, S.; Chen, K.J.; Campbell, R. L.; Hickey, J. L.; Tan, J.; Scully, C. C. G.; Davies, P. L.; Yudin, A. K.; Zaretsky, S. *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 5403 – 5415. (b) Ono, Y.; Sorimachi, H. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, 1824, 224 – 236.

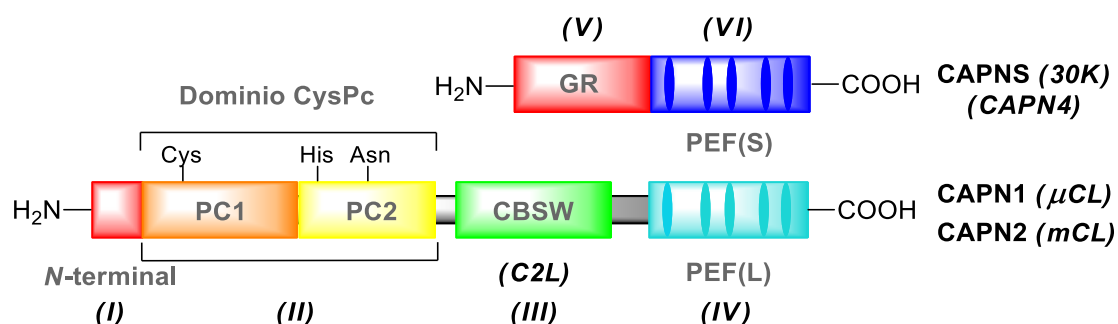
<sup>67</sup> Carragher, N. O. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, 12, 615 – 638.

<sup>68</sup> (a) Sorimachi, H.; Mamitsuka, H.; Ono, Y. *Biol. Chem.* **2012**, 393, 853 – 871. (b) Saez, M. E.; Ramirez-Lorca, R.; Moron, F. J.; Ruiz, A. *Drug Discov. Today* **2006**, 11, 917 – 923.

### 3.1.2.2. Estructura

Las calpaínas se encuentran presentes en casi todos los organismos eucariotas y algunas bacterias, e incluyen una gran variedad de isoformas. Los humanos expresan 15 genes de calpaínas (CAPN1 – CAPN16, exceptuando la CAPN4). Todas ellas poseen como elemento estructural y funcional característico el dominio CysPc –dominio proteolítico que en la mayoría de los casos posee la tríada catalítica Cys-His-Arg– que conforma un bolsillo catalítico activo en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Las calpaínas más estudiadas son las calpaínas 1 y 2, previamente denominadas  $\mu$ -calpaína y m-calpaína, respectivamente, debido a los requerimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  para su activación *in vitro* ( $\mu\text{M}$  y  $\text{mM}$ ). Ambas son heterodímeros, con una estructura bastante similar. Presentan una subunidad catalítica grande (82 kDa en el caso de la calpaína 1, y 80 kDa para la calpaína 2), codificada por un gen específico para cada una de ellas, CAPN1 y CAPN2 –con una homología del 55-65%–, y una subunidad reguladora pequeña (28 kDa) común a ambas calpaínas denominada CAPNS1 (también conocida como CAPN4).<sup>67</sup> Asimismo, cada una de las subunidades presenta distintos dominios.<sup>67,69</sup> la subunidad reguladora presenta cuatro dominios distintos y la subunidad catalítica dos. En la **Figura 3.1** se muestran los mismos de forma esquemática.



**Figura 3.1.** Representación esquemática de los dominios de las subunidades reguladora (arriba) y catalítica (abajo) de las calpaínas 1 y 2. Entre paréntesis se incluye la denominación previa de cada uno de los dominios y de las subunidades. Adaptada de las referencias 63 y 69.

<sup>69</sup> Ono, Y.; Saido, T. C.; Sorimachi, H. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2016**, *15*, 854 – 876.

### **Subunidad catalítica (CAPN1 o CAPN2)**

- **Dominio N-terminal (Dominio I).** Suele formar una hélice  $\alpha$  en las calpaínas típicas, y su función no ha sido determinada por el momento.
- **Dominio CysPc (Dominio II).** Es el dominio catalítico de la proteasa, presente en toda la familia de calpaínas. Está constituido por dos subdominios, PC1 (*protease-core 1*) y PC2, y contiene una tríada catalítica característica de otras cisteín proteasas, compuesta por los aminoácidos cisteína, histidina y asparagina. El residuo Cys (en la posición 115 en CAPN1 y 105 en CAPN2) constituye el sitio activo, y se encuentra en el subdominio PC1, mientras que la His (272 (CAPN1), 262 (CAPN2)) y la Asn (296 (CAPN1), 286 (CAPN2)) se encuentran en PC2.<sup>70</sup>
- **Dominio  $\beta$ -sandwich tipo calpaína, CBSW (Dominio III, C2L (C2-domain-like)).** Está constituido por 8 láminas  $\beta$  y un bucle ácido (*acidic loop*) que puede estar en contacto con regiones básicas de PC2 mediante interacciones electrostáticas,<sup>67</sup> participando en la regulación de la actividad de la calpaína.<sup>71</sup> Conecta el dominio catalítico CysPc y el dominio responsable de la unión con el  $\text{Ca}^{2+}$  PEF(L), y puede estar implicado en la unión con fosfolípidos.<sup>72</sup> Asimismo, tiene dos secuencias tipo manos EF de unión al  $\text{Ca}^{2+}$ , en las regiones que limitan con CysPc y PEF(L).<sup>70</sup>
- **Dominio PEF(L) (penta-EF-hand) (Dominio IV).** También se le denomina dominio tipo calmodulina. Contiene cinco grupos de manos EF;<sup>73</sup> los cuatro primeros pueden unirse al  $\text{Ca}^{2+}$ , y el último constituye el extremo  $-\text{COOH}$  terminal y está involucrado en la dimerización con la subunidad reguladora pequeña (CAPNS).

---

<sup>70</sup> Goll, D. E.; Thompson, V. F.; Li, H.; Wei, W.; Cong, J. *Physiol. Rev.* **2003**, 83, 731 – 801

<sup>71</sup> Strobl, S.; Fernandez-Catalan, C.; Braun, M.; Huber, R.; Masumoto, H.; Nakagawa, K.; Irie, A.; Sorimachi, H.; Bourenkow, G.; Bartunik, H. *PNAS USA* **2000**, 97, 588 – 592.

<sup>72</sup> Tompa, P.; Emori, Y.; Sorimachi, H.; Suzuki, K.; Friedrich, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 280, 1333 – 1339.

<sup>73</sup> **Manos EF:** Motivo estructural del tipo hélice-bucle-hélice presente en un gran número de proteínas que se unen al calcio (ej. calmodulina), y toma su nombre de la nomenclatura tradicional de proteínas. Está constituido por dos hélices  $\alpha$  (hélices E y F) unidas por una región corta de doce aminoácidos aproximadamente, formando la zona de unión al  $\text{Ca}^{2+}$ . Mckee, T.; Mckee, J. R. *Bioquímica*, Mc Graw Hill Interamericana **2003**, 3ª Ed, 133 – 134.



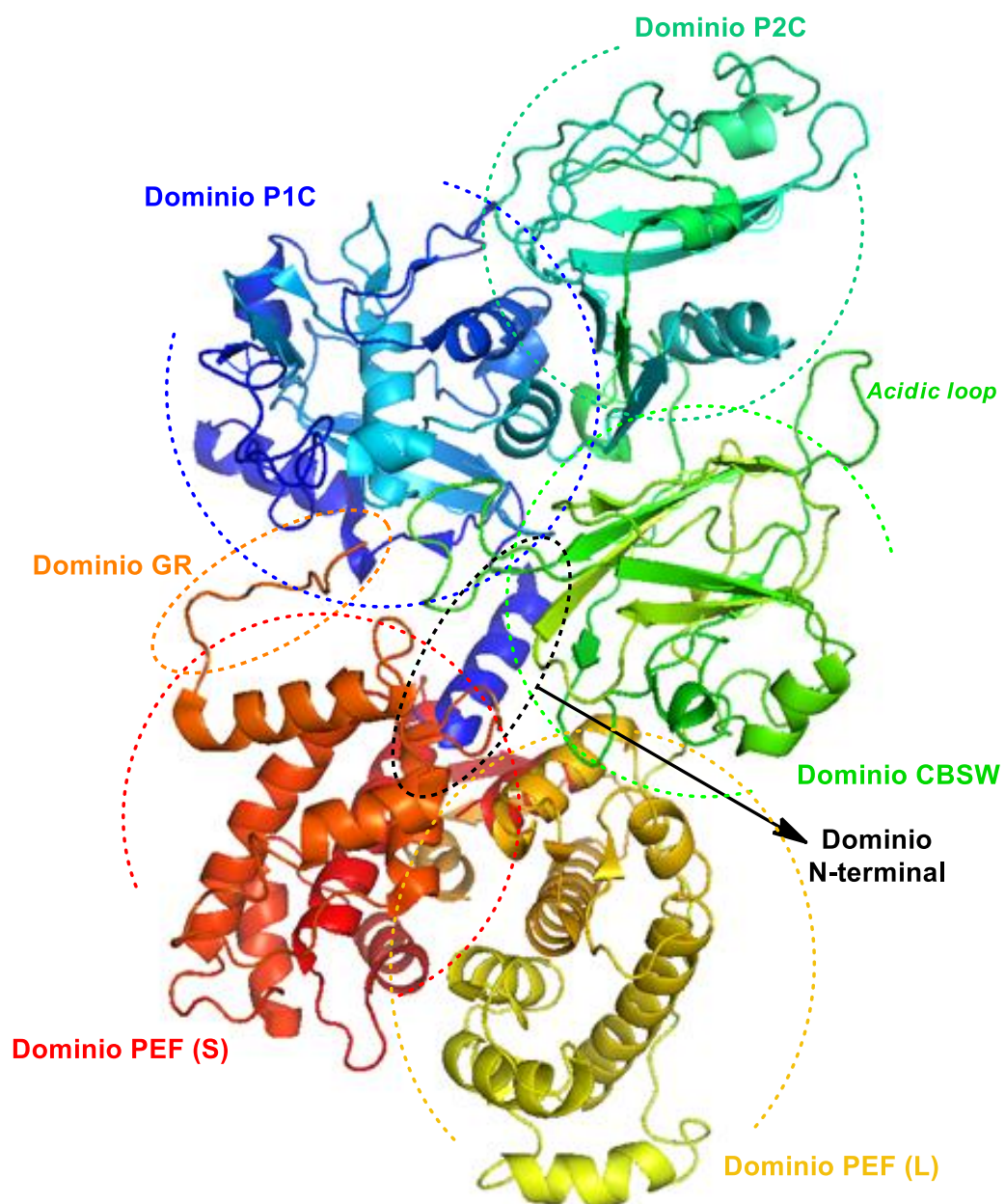
***Subunidad reguladora CAPNS (CAPN4)***

- **Dominio GR (*Glycine-rich*) (Dominio V).** Es la región *N*-terminal de la subunidad, rica en residuos de glicina, y puede interaccionar con membranas o proteínas de membrana mediante interacciones hidrofóbicas.<sup>70,74</sup>
- **Dominio PEF(S) (Dominio VI).** Dominio tipo calmodulina, constituye la región –COOH terminal de la subunidad. Contiene cinco grupos de manos EF: los cuatro primeros pueden unirse al  $\text{Ca}^{2+}$  y el último está involucrado en la unión con el dominio PEF(L) de la subunidad grande en las calpaínas 1 ó 2.

La subunidad reguladora es esencial para la estabilidad de las calpaínas 1 y 2. Al poseer estos dominios PEF, se considera a estas calpaínas miembros de la familia de proteínas *penta-EF-hand* (PEF). Al igual que otros miembros de esta familia, forman dímeros en los que los dominios PEF están involucrados, y se asocian con membranas. Los dominios PEF(L) y PEF(S) podrían jugar un papel importante en la dependencia del calcio para la actividad de las calpaínas.<sup>67</sup>

La **Figura 3.2** muestra la estructura cristalográfica de la calpaína 2, la única calpaína cuya estructura cristalográfica está descrita por completo. Para el resto de calpaínas sólo se han logrado cristalizar algunos de sus dominios e incluso para algunas aún no se han obtenido estructuras cristalográficas.

<sup>74</sup> Masumoto, H.; Nakagawa, K.; Irie, S.; Sorimachi, H.; Suzuki, K.; Bourenkov, G. P.; Bartunik, H.; Fernandez-Catalan, C.; Bodec, W.; Strobl, S. *Acta Cryst.* **2000**, *D56*, 73 – 75.



**Figura 3.2.** Estructura cristalográfica de la calpaína 2 humana en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (PDB: 1KFU).

### 3.1.2.3. Clasificación

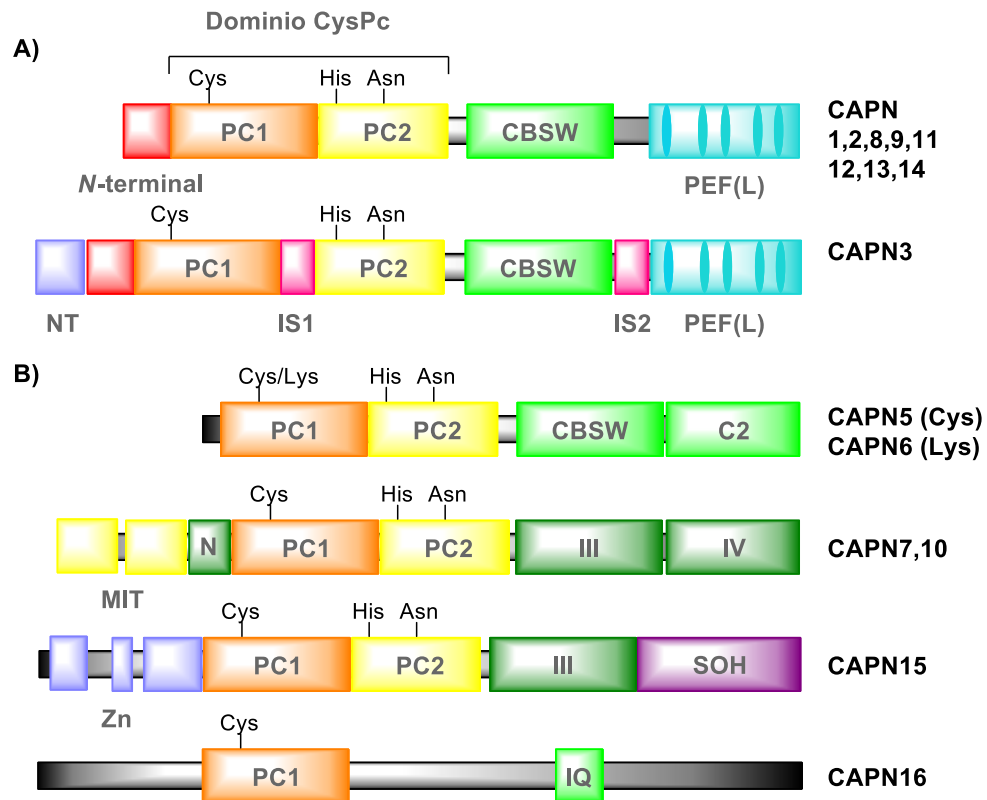
Las calpaínas más ampliamente estudiadas son la 1 y la 2. El resto se fueron descubriendo progresivamente y clasificando en base a distintos criterios: estructura, distribución, etc. A continuación se muestra la clasificación atendiendo a su estructura.

- **Calpaínas típicas o clásicas (1, 2, 3, 8, 9, 11, 12, 13 y 14).** Las calpaínas pertenecientes a este grupo tienen una estructura similar a la descrita para las calpaínas 1 y 2, y se caracterizan por poseer cinco manos EF en el dominio PEF(L). Están constituidas por una subunidad catalítica grande formada por cuatro dominios que, excepto para las calpaínas 1, 2 y 9, no parece estar asociada a otra subunidad pequeña reguladora. La CAPN3 además contiene un dominio específico *N*-terminal conocido como NT (*nuclear translocation domain*)<sup>75</sup> y dos secuencias de inserción: IS1, una secuencia de 62 aminoácidos insertada entre los subdominios PC1 y PC2, cuya función aún no se ha determinado, e IS2, de 77 aminoácidos, situada entre los dominios CBSW y PEF, que parece incluir una secuencia de localización nuclear (**Figura 3.3**).<sup>67</sup>
- **Calpaínas atípicas (5, 6, 7, 10, 15 y 16).** Este grupo es muy dispar, sus miembros poseen en su estructura un dominio catalítico CysPc pero carecen de manos EF y algunos dominios funcionales han sido suprimidos o reemplazados por otros.
  - Las CAPN5 y CAPN6 tienen además el dominio CBSW, y en lugar del PEF poseen otro dominio C2. En la calpaína 6 el residuo de cisteína de su sitio catalítico se encuentra sustituido por un residuo de lisina.<sup>67,75</sup>
  - Las CAPN7 y CAPN10 poseen además un dominio *N*-terminal grande que incluye dos dominios MIT (*microtubule interaction and transport motif*), y dos dominios (III y IV) en el extremo *C*-terminal. Junto a las calpaínas 5 y 6, pertenecen a la subfamilia PaIB.
  - La CAPN15, también denominada SOL H<sup>76</sup> (*Small optic lobe homology*) tiene en su extremo *N*-terminal un dominio que contiene 5 motivos “dedo de zinc”,<sup>77</sup> así como un dominio SOH (*SOL-homology domain*).

<sup>75</sup> Saez, M. E.; Ramirez-Lorca, R.; Moron, F. J.; Ruiz, A. *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 917 – 923.

<sup>76</sup> Kamei, M.; Webb, G. C.; Young, I. G.; Campbell, H. D. *Genomics* **1998**, *51*, 197 – 206.

- La CAPN16, también denominada *demi-calpain*, o *half-calpain*, únicamente presenta el subdominio PC1.



**Figura 3.3.** Estructura de las calpaínas. A) Calpaínas típicas o clásicas. B) Calpaínas atípicas. Imagen adaptada de la ref. 63.

También se puede realizar una clasificación de las calpaínas teniendo en cuenta su distribución en los distintos tipos de células: ubicuas (presentes en casi todos los tejidos) o específicas de tejido. En la **Tabla 3.1** se muestra la localización de las distintas calpaínas, indicando si pertenecen al grupo de las típicas o las atípicas<sup>67,69</sup>

<sup>77</sup> **Dedo de zinc:** Motivo estructural encontrado habitualmente en proteínas que interaccionan con el DNA. Son ricos en residuos de cisteína, permitiendo de este modo la unión de distintas partes del motivo formando estas estructuras con forma de dedos.

**Tabla 3.1.** Familia de las calpaínas. Localización y clasificación.

<b>Calpaína</b>	<b>Localización</b>	<b>Típica/Atípica (subgrupo)</b>
CAPN1	Ubicua	Típica
CAPN2	Ubicua	Típica
CAPN3	Músculo, retina	Típica
CAPN5	Ubicua/intestino y testículos	Atípica (PaIB)
CAPN6	Placenta	Atípica (PaIB)
CAPN7	Ubicua	Atípica (PaIB)
CAPN8	Estómago	Típica
CAPN9	Tracto digestivo	Típica
CAPN10	Ubicua/específica	Atípica (PaIB)
CAPN11	Testículos	Típica
CAPN12	Folículos pilosos, piel	Típica
CAPN13	Testículos y pulmón	Típica
CAPN14	Esófago	Típica
CAPN15	Ubicua	Atípica (SOL)
CAPN16	Testículos	Atípica

\*La CAPN4, o CAPNS, constituye la subunidad reguladora de las calpaínas 1 y 2.

#### 3.1.2.4. Mecanismo de activación y de regulación de la calpaína<sup>67,70</sup>

La calpaína se localiza habitualmente en el citosol, comportándose como una enzima inactiva y, en respuesta a un incremento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  celulares, se desplaza hacia la membrana, donde se produce su activación en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfolípidos, a través de un mecanismo<sup>78,79</sup> que conlleva dos etapas:

**1º Etapa – Liberación de las restricciones conformacionales.** Cuando la calpaína se encuentra en su forma inactiva, las interacciones presentes entre sus dominios implican ciertas restricciones conformacionales que impiden la formación del sitio catalítico. La unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a las manos EF de los dominios PEF(L) y PEF(S) provoca la ruptura de la interacción del dominio PEF(S) con el *N*-terminal de la subunidad catalítica, produciéndose la hidrólisis autocatalítica de éste último y la disociación de las subunidades catalítica y reguladora. Por otro lado, la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  al bucle ácido del dominio CBSW interrumpe las interacciones electrostáticas del mismo con el subdominio P2C, liberando las restricciones estructurales.

**2º Etapa – Formación del sitio activo.** La unión de dos átomos de  $\text{Ca}^{2+}$  al dominio CysPc (un átomo al subdominio P1C y otro al P2C) desencadena un cambio conformacional que produce un acercamiento entre ambos subdominios, de forma que la distancia que separa el residuo de Cys de los de His y Asp se reduce desde 1.05 nm hasta 0.37 nm, permitiendo la interacción entre ellos y la formación de la tríada catalítica, que establece un sitio catalítico funcional.<sup>67,69,80,81</sup>

Cuando la calpaína carece de los dominios CBSW o PEF, la activación sólo involucra la segunda etapa. Además de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , existen otros mecanismos de regulación de la actividad de la calpaína (**Figura 3.4**): Factores de crecimiento (Ej. EGF (*Epidermal growth factor*)) activan la calpaína 2,<sup>82,67</sup> la proteína kinasa A (PKA) inactiva la calpaína mediante la fosforilación del residuo Ser-369 en el dominio

---

<sup>78</sup> Moldoveanu, T.; Hosfield, C. M.; Lim, D.; Elce, J. S.; Jia, Z.; Davies, P. L. *Cell* **2002**, 108, 649 – 660.

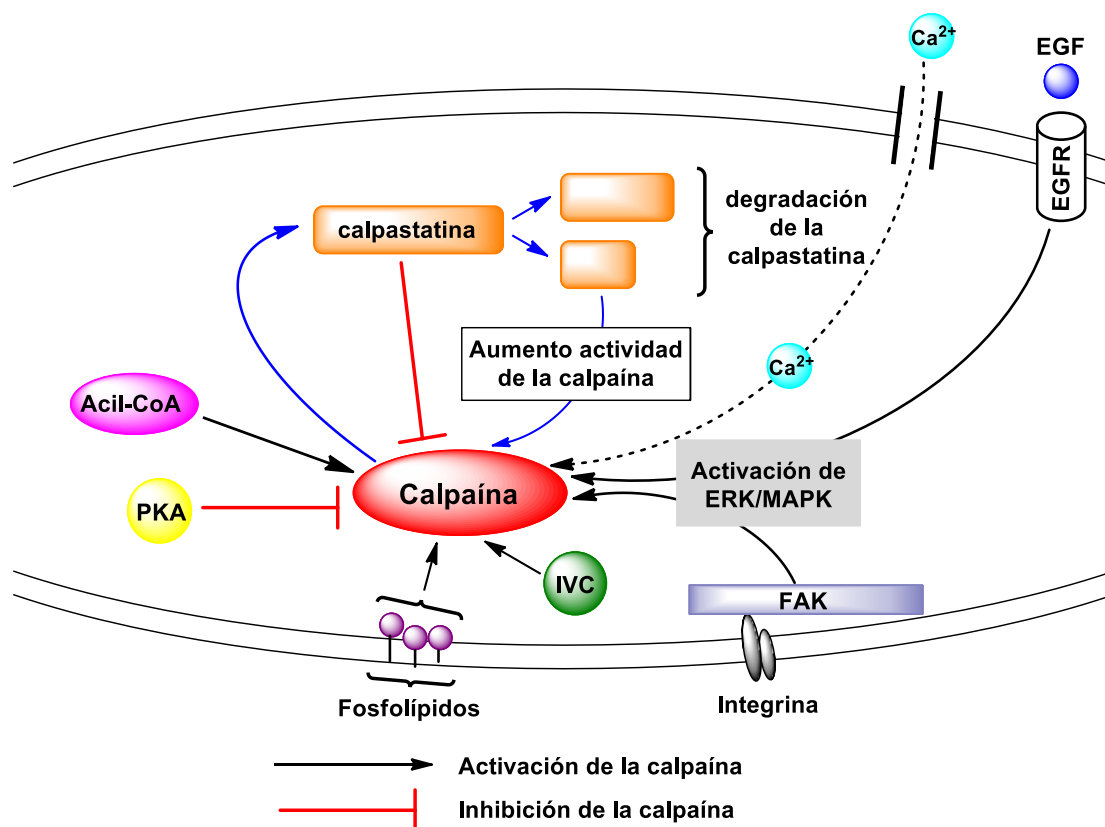
<sup>79</sup> Nakagawa, K.; Masumoto, H.; Sorimachi, H.; Suzuki, K. *J. Biochem.* **2001**, 130, 605 – 611.

<sup>80</sup> Suzuki, K.; Hata, S.; Kawabata, Y.; Sorimachi, H. *Diabetes* **2004**, 53, S12 – S18.

<sup>81</sup> Nemova, N. N.; Lysenko, L. A.; Kantserova, N. P. *Ontogenez* **2010**, 41, 381 – 389.

<sup>82</sup> Glading, A.; Bodnar, R. J.; Reynolds, I. J.; Shiraha, H.; Satish, L.; Potter, D. A.; Blair, H. C.; Wells, A. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, 24, 2499 – 2512.

CBSW,<sup>83</sup> la kinasa de adhesión focal (FAK) activa la calpaína 2 actuando como un *scaffold* de unión con ERK/MAPK,<sup>84</sup> la unión de la calpaína a “co-activadores” (Ej. isovalerocarnitina (IVC), proteína Acil-CoA)<sup>85</sup> facilita su activación, la calpastatina, inhibidor endógeno natural de la calpaína, puede inhibir cuatro moléculas de calpaína de forma simultánea y su degradación puede estar mediada por calpaínas.<sup>86</sup>



**Figura 3.4.** Mecanismo de regulación de la calpaína (adaptado de la ref. 67).

<sup>83</sup> Shiraha, H.; Glading, A.; Chou, J.; Jia, Z.; Wells, A. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, 22, 2716 – 2727.

<sup>84</sup> Carragher, N. O.; Westhoff, M. A.; Fincham, V. J.; Schaller, M. D.; Frame, M. C. *Curr. Biol.* **2003**, 13, 1442 – 1450.

<sup>85</sup> (a) Pontremoli, S.; Melloni, E.; Viotti, P. L.; Michetti, M.; Di Lisa, F.; Siliprandi, N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, 167, 373 – 380. (b) Melloni, E.; Aversa, M.; Salamino, F.; Sparatore, B.; Minafra, R.; Pontremoli, S. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 82 – 86.

<sup>86</sup> Pietsch, M.; Chua, K. C. H.; Abell, A. D. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, 10, 279 – 293.

#### 3.1.2.5. Función fisiológica de las calpaínas<sup>67</sup>

Aún no se ha determinado con claridad la función fisiológica exacta que desempeñan las calpaínas. No obstante, se han identificado sustratos fisiológicos que, junto con estudios a nivel molecular y farmacológico, han proporcionado indicios sobre la misma.

Entre las proteínas identificadas como sustratos de calpaína se encuentran proteínas citoesqueléticas, receptores de membrana, kinasas y factores de transcripción. La proteólisis mediada por calpaínas tiene lugar a través de una escisión proteolítica preferente de ciertos sustratos en fragmentos estables, y puede modular la función de los mismos. Ejemplos de ello son la aparición de fragmentos de colágeno degradado en la aterosclerosis, debidos a la proteólisis de la kinasa pp125FAK mediada por las calpaínas 1 y 2,<sup>87</sup> la generación de fragmentos dominantes<sup>88</sup> o proteínas activas con funciones definidas en moléculas de señalización, y la alteración de la distribución de proteínas<sup>89</sup> y el aumento de la estabilidad de otros sustratos.<sup>90</sup>

Otros sustratos de calpaína interesantes son la proteína reguladora p35, que interviene en el desarrollo del tejido nervioso, que tras una proteólisis mediada por calpaínas se transforma en p25, un activador de la kinasa CDK5 (*cyclin-dependent kinase 5*), implicada en la formación de la memoria,<sup>91</sup> y la oncoproteína MYC, cuya escisión mediada por calpaínas es un paso determinante en la transformación de las funciones y localización de esta molécula clave en la supervivencia celular en cáncer.<sup>69</sup>

Cabe destacar la influencia de la actividad de las calpaínas en distintos procesos fisiológicos, tales como la activación de plaquetas, la migración y proliferación celular, la apoptosis y la transducción de la señal, entre otros.<sup>67</sup>

---

<sup>87</sup> Cooray, P.; Yuan, Y.; Schoenwaelder, S. M.; Mitchell, C. A.; Salem, H. H.; Jackson, S. P. *Biochem. J.* **1996**, *318*, 41 – 47.

<sup>88</sup> Kulkarni, S.; Goll, D. E.; Fox, J. E. B. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 24435 – 24441.

<sup>89</sup> Carragher, N. O.; Levkau, B.; Ross, R.; Raines, E. W. *J. Cell. Biol.* **1999**, *147*, 619 – 629.

<sup>90</sup> Welm, A. L.; Timchenko, N. A.; Ono, Y.; Sorimachi, H.; Radomska, H. S.; Tenen, D. G.; Lekstrom-Himes, J.; Darlington, G. J. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 33848 – 33856.

<sup>91</sup> Taniguchi, S. Fujita, Y.; Hayashi, S.; Kakita, A.; Takahashi, H.; Murayama, S.; Saido, T. C.; Hisanaga, S.; Iwatsubo, T.; Hasegawa, M. *FEBS Lett.* **2001**, *489*, 46 – 50.



### 3.1.2.6. Implicación de las calpaínas en enfermedades humanas<sup>69</sup>

Las calpaínas están involucradas en distintas patologías en humanos. A continuación, se describen algunas de las más relevantes.

**Desórdenes neurodegenerativos.** Se han encontrado niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  y de las calpaínas 1 y 2 elevados en tejido cerebral de pacientes con enfermedad de Alzheimer (AD)<sup>91,92</sup> y se ha observado una mejora en la memoria y función sináptica mediante la utilización de inhibidores de calpaínas en ratones modelo de AD. Por otro lado, p25 es responsable de la hiperfosforilación de la proteína tau, y la formación de aglomerados de la misma lleva a la formación de ovillos neurofibrilares, implicados en distintos desórdenes neurodegenerativos.<sup>93</sup> Además, la deficiencia de calpastatina produce un aumento de la amiloidosis amiloide  $\beta$  ( $\text{A}\beta$ ) y eleva la neuroinflamación en ratones con sobreexpresión de la proteína precursora amiloide (APP). La calpaína 2 también se encuentra sobreexpresada en el cerebro de pacientes con Parkinson, y las calpaínas pueden escindir la proteína HTT (*Huntington protein*), generando fragmentos proteicos tóxicos que conllevan una pérdida neuronal, estando involucradas en la enfermedad de Huntington.<sup>94</sup>

**Isquemia cerebral.** Esta patología tiene como resultado la falta de glucosa en el tejido neuronal, un agotamiento del ATP y un aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ . La isquemia cerebral transitoria va acompañada de la activación de calpaínas, y la administración del inhibidor ALLN<sup>95</sup> protege al cerebro frente al daño isquémico.

<sup>92</sup> (a) Saito, T.; Matsuba, Y.; Mihira, N.; Takano, J.; Nilsson, P.; Itohara, S.; Iwata, N.; Saido, T. C. *Nat. Neurosci.* **2014**, *17*, 661 – 663. (b) Nilsson, P.; Saito, T.; Saido, T. C. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5*, 499 – 502.

<sup>93</sup> Deutsch, S. I.; Rosse, R. B.; Lakshman, R. M. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.* **2006**, *30*, 1369 – 1380.

<sup>94</sup> (a) Wang, Y.; Gu, Z.; Qin, Z. *Neurosci. Bull.* **2005**, *21*, 224 – 229. (b) Southwell, A. L.; Bugg, C. W.; Kaltenbach, L. S.; Dunn, D.; Butland, S.; Weiss, A.; Paganetti, P.; Lo, D. C.; Patterson, P. H. *PLoS One*. **2011**, *6*, e16676.

<sup>95</sup> Yokota, M.; Tani, E.; Tsubuki, S.; Yamaura, I.; Nakagaki, I.; Hori, S.; Saido, T. C. *Brain Res.* **1999**, *819*, 8 – 14.

**Desórdenes cardiovasculares.** Mecanismos patológicos de algunos desórdenes cardiovasculares agudos<sup>96</sup> podrían implicar la proteólisis mediada por calpaínas de proteínas del miocardio.<sup>97,98</sup> Ciertas lesiones cardíacas podrían ser prevenidas con la administración del inhibidor de calpaínas **MDL-28170**,<sup>99</sup> y **A-705253** exhibió efectos protectores de las funciones cardíacas en un modelo porcino con isquemia miocárdial.<sup>100</sup>

**Cáncer.** El sistema calpaína-calpastatina juega un papel importante en cáncer, observándose roles opuestos en distintos tipos de cáncer.<sup>101</sup> La calpaína 2 produce una escisión de la oncoproteína MYC, dando lugar a MYC-nick, que se encuentra regulada al alza en células cancerosas.<sup>102</sup> La CAPN3 se encuentra altamente expresada en líneas celulares de melanoma<sup>103</sup> y en vejigas bovinas con tumores uroteliars, y la CAPN9 en cáncer de estómago y enfermedades de riñón y de corazón. La actividad de calpaína aumenta de forma significativa en el tejido mamario de pacientes con cáncer de mama, sobre todo en tumores con sobreexpresión de receptores de estrógeno, y el tratamiento con el inhibidor calpeptina inhibe el crecimiento de las células cancerosas.<sup>67</sup> Además, las calpaínas 1 y 2 regulan maquinarias celulares de eliminación de fármacos, reduciendo la eficacia de terapias antitumorales.<sup>104</sup>

**Cataratas.** Resultan de la agregación de cristalinós, causada por daño oxidativo o sobre-proteólisis mediada por calpaínas (u otras proteasas). La causa principal del aumento de la opacidad de las estructuras oculares es la falta de regulación de la

<sup>96</sup> Sorimachi, H.; Ono, Y. *Cardiovasc. Res.* **2012**, *96*, 11 – 22.

<sup>97</sup> Kang, M. -Y.; Zhang, Y.; Matkovich, S. J.; Diwan, A.; Chishti, A. H.; Dorn, G. W. II *Circ. Res.* **2010**, *107*, 903 – 912.

<sup>98</sup> Nishida, K.; Yamaguchi, O.; Otsu, K. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2015**, *84*, 212 – 222.

<sup>99</sup> Mehdi, S. *Trends Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 150 – 153.

<sup>100</sup> Khalil, P. N.; Neuhof, C.; Huss, R.; Pollhammer, M.; Khalil, M. N.; Neuhof, H.; Fritz, H.; Siebeck, M. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *528*, 124 – 131.

<sup>101</sup> Leloup, L.; Wells, A. *Expert Opin. Ther. Targets* **2011**, *15*, 309 – 323.

<sup>102</sup> (a) Conacci-Sorrell, M.; Ngouenet, C.; Eisenman, R. N. *Cell* **2010**, *142*, 480 – 493. (b) Conacci-Sorrell, M.; Ngouenet, C.; Anderson, S.; Brabletz, T.; Eisenman, R. N. *Genes Dev.* **2014**, *28*, 689 – 707.

<sup>103</sup> Weeraratna, A. T.; Becker, D.; Carr, K. M.; Duray, P. H.; Rosenblatt, K. P.; Yang, S.; Chen, Y.; Bittner, M.; Strausberg, R. L.; Riggins, G. J.; Wagner, U.; Kallioniemi, O. P.; Trent, J. M.; Morin, P. J.; Meltzer, P. S. *Oncogene* **2004**, *23*, 2264 – 2274.

<sup>104</sup> Grieve, S.; Gao, Y.; Hall, C.; Hu, J.; Greer, P. A. *Mol. Cell. Biol.* **2016**, *36*, 2078 – 2088.

CAPN2, la cual tiene un papel fundamental en la cataractogénesis.<sup>105</sup> El inhibidor macrocíclico **CAT811** ha sido testado sobre un modelo ovino con desarrollo de cataratas hereditario, observándose una disminución de la afección.<sup>106,107</sup>

**Distrofia muscular limb-girdle tipo 2A (LGMD2A).** La CAPN3 se expresa de forma predominante en el músculo esquelético, donde se une a la titina, confiriendo estabilidad e inhibiendo la autólisis de la célula muscular, y fue identificada como la responsable de la LGMD2A,<sup>108</sup> enfermedad en la cual la calpaína 3 tiene una mutación.

**Diabetes tipo II.**<sup>109</sup> La CAPN10 se encuentra en concentraciones elevadas en tejidos como el riñón y el páncreas, y se han identificado variantes genéticas del gen CAPN10 asociados con niveles elevados de ácidos grasos, resistencia a la insulina y diabetes mellitus de tipo 2. Además, se ha observado un aumento de la actividad de calpaínas en células del túbulo proximal renal (RPT) de ratas sometidas a hipoxia, y algunos inhibidores de calpaínas han mostrado efectos citoprotectores en cultivos celulares de RTP. El inhibidor **ALLN** protege el tejido renal frente al daño producido por isquemia.

**Síndrome metabólico.** Se conoce como síndrome metabólico a la presencia conjunta en un individuo de varios factores de riesgo que aumentan la probabilidad de padecer una enfermedad cardiovascular y diabetes tipo II. Entre estos factores se encuentran hipertensión arterial, niveles de glucosa y triglicéridos en sangre elevados y bajos niveles de HDL en sangre. La CAPN5 está relacionada con la hipertensión y otros factores presentes en el síndrome metabólico.

<sup>105</sup> David, L. L.; Shearer, T. R. *Exp. Eye Res.* **1986**, *42*, 227 – 238.

<sup>106</sup> Abell, A. D.; Jones, M. A.; Coxon, J. M.; Morton, J. D.; Aitken, S. G.; McNabb, S. B.; Lee, H. Y.-Y.; Mehrrens, J. M.; Alexander, N. A.; Stuart, B. G.; Neffe, A. T.; Bickerstaffe, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1455 – 1458.

<sup>107</sup> Morton, J. D.; Lee, H. Y.-Y.; McDermott, J. D.; Robertson, L. J. G.; Bickerstaffe, R.; Jones, M. A.; Coxon, J. M.; Abell, A. D. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2013**, *54*, 389 – 395.

<sup>108</sup> (a) Ono, Y.; Shimada, H.; Sorimachi, H.; Richard, I.; Saido, T. C.; Beckmann, J. S.; Ishiura, S.; Suzuki, K. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 17073–17078. (b) Richard, I.; Roudaut, C.; Marchand, S.; Baghdiguian, S.; Herasse, M.; Stockholm, D.; Ono, Y.; Suel, L.; Bourg, N.; Sorimachi, H.; Lefranc, G.; Fardeau, M.; Sebille, A.; Beckmann, J. S. *J. Cell Biol.* **2000**, *151*, 1583 – 1590.

<sup>109</sup> Branca, D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *322*, 1098 – 1104.

#### 3.1.3. INHIBIDORES DE CALPAÍNAS

Dada la implicación de las calpaínas en numerosas enfermedades, el desarrollo de inhibidores que modulen su actividad presenta gran interés en la actualidad. A continuación se exponen aspectos generales sobre el inhibidor natural y algunos inhibidores sintéticos desarrollados en busca de una mejora en la potencia y la selectividad.

##### 3.1.3.1. Inhibidor natural: Calpastatina<sup>110</sup>

El inhibidor endógeno de la calpaína es la calpastatina, una proteína que inhibe de forma selectiva las calpaínas 1 y 2 ( $IC_{50}$ = 0.50–1.57 nM (CAPN1), 0.83–1.34 nM (CAPN2),<sup>86</sup> siendo inactivo frente a otras cisteín proteasas (papaína, cathepsina B, bromelina, etc.) y otras familias de proteasas, así como para el resto de calpaínas. Está constituida por cinco dominios: un dominio *N*-terminal no inhibitorio (dominio L), y cuatro dominios idénticos inhibitorios (dominios I-IV), de unos 140 aminoácidos cada uno, capaces de unirse e inhibir a cuatro moléculas de calpaína de forma simultánea.<sup>86</sup>

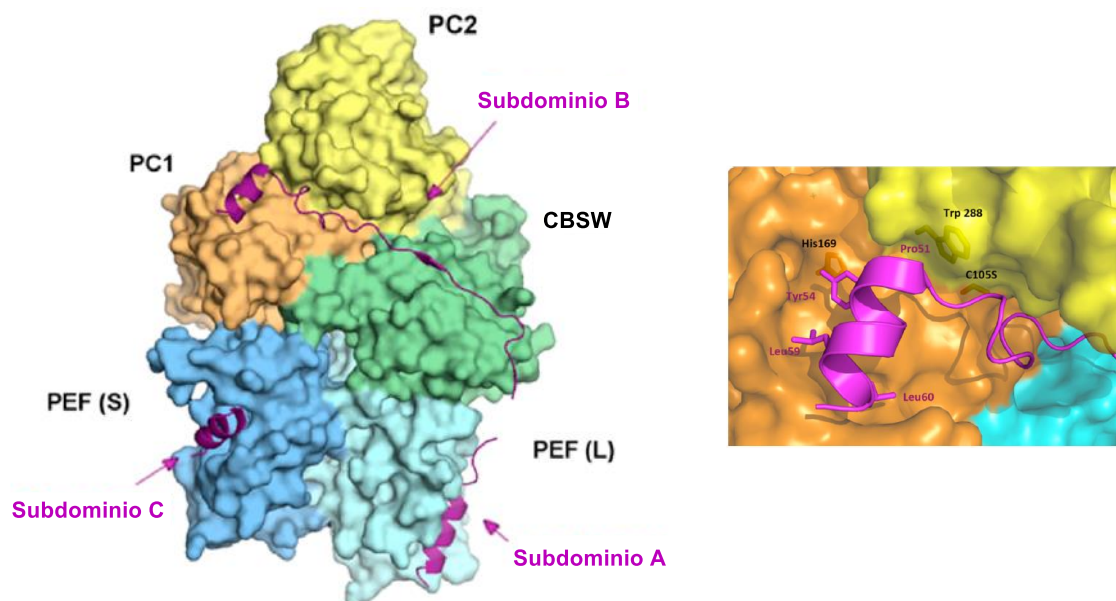
El dominio L está implicado en la regulación de la calpastatina e interviene en su distribución intracelular: a concentraciones bajas de iones  $Ca^{2+}$  se agrega en forma de gránulos cerca del núcleo celular (proceso regulado por la proteína quinasa A, que fosforila a la calpastatina en el dominio L); un aumento de los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular conlleva su solubilización y redistribución en el citosol<sup>111</sup> (proceso regulado por fosfoproteínasas, que desfosforilan a la calpastatina).<sup>110</sup>

El efecto inhibitorio de los dominios I-IV de la calpastatina se produce de forma rápida, reversible y competitiva, y se debe a la presencia de tres subdominios dentro de cada dominio (A, B y C). Los subdominios A y C presentan cierta helicidad, e interaccionan con los dominios PEF(S) y PEF(L) de la calpaína,<sup>110</sup> mientras que las regiones intermedias son flexibles, con ciertos rasgos estructurales en el subdominio B, que se une al sitio activo de la calpaína. En la **Figura 3.5** se muestra la estructura cristalina del dominio IV de la calpastatina unido a la calpaína 2 en presencia de  $Ca^{2+}$ .

---

<sup>110</sup> Melloni, E.; Averna, M.; Stifanese, R.; De Tullio, R.; Defranchi, E.; Salamino, F.; Pontremoli, S. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 24945 – 24954.

<sup>111</sup> De Tullio, R.; Passalacqua, M.; Averna, M.; Salamino, F.; Melloni, E.; Pontremoli, S. *Biochem. J.* **1999**, *343*, 467 – 472.



**Figura 3.5.** A la izquierda, estructura cristalina del complejo CAPN2-calpastatina en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Calpastatina representada en color morado. A la derecha, ampliación de la zona de unión del dominio B al sitio activo (tomada de las ref. 66a, 112 y 113).

El subdominio B se extiende formando un bucle alrededor del sitio activo de la calpaína Cys105. La región *N*-terminal de este bucle se asocia mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas al dominio CBSW de la calpaína, y la región *C*-terminal del bucle forma una hélice  $\alpha$  que se une al dominio *N*-terminal de la calpaína. Los subdominios A y C forman hélices  $\alpha$  anfipáticas al unirse a los bolsillos hidrofóbicos inducidos por  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en los dominios PEF(L) y PEF(S) de la calpaína. La inhibición óptima de la calpastatina requiere la unión simultánea a la calpaína por los tres subdominios A, B y C.<sup>86</sup>

<sup>112</sup> Campbell, R. L.; Davies, P. L. *Biochem. J.* **2012**, 447, 335 – 351.

<sup>113</sup> Jo, H.; Meinhardt, N.; Wu, Y.; Kulkarni, S.; Hu, X.; Low, K. E.; Davies, P. L.; DeGrado, W. F.; Greenbaum, D. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 17704 – 17713.

#### 3.1.3.2. Inhibidores sintéticos<sup>114,115,116</sup>

Con el objetivo de obtener inhibidores activos y selectivos, se han sintetizado un gran número de compuestos que interaccionan con la calpaína de forma reversible o irreversible. La mayor parte actúan sobre el sitio catalítico aunque también se han descrito inhibidores alostéricos. A continuación se presentan divididos en dos grupos: inhibidores peptídicos o peptidomiméticos, e inhibidores no peptídicos.

##### A) Inhibidores peptídicos o peptidomiméticos

La mayor parte de los inhibidores de calpaínas sintetizados hasta la fecha pertenecen a este grupo. Son inhibidores dirigidos al sitio catalítico, mimetizando la acción biológica de la calpastatina. Por lo general están constituidos por unos pocos aminoácidos con alguna funcionalidad electrófila en el extremo C-terminal que se une al residuo Cys del sitio activo de la calpaína. Dependiendo del grupo funcional que interacciona con el sitio activo (*warhead*), se pueden dividir en varios grupos.

##### A.1. Péptidos derivados del subdominio B de la calpastatina

El péptido *N*-acetilado 27-mer derivado del subdominio B de la calpastatina humana (**CP1B**)<sup>117</sup> resultó ser un inhibidor muy potente y selectivo para calpaína ( $K_i$ :<sup>118</sup> 0.2 nM (calpaína)) pero presentó una mala penetración celular,<sup>117b</sup> inconveniente que fue superado mediante su conjugación con péptidos con buena penetrabilidad celular (p.e. penetratina o poliarginina).<sup>114</sup> **PCP1B**, su conjugado con penetratina,<sup>119</sup> demostró una reducción de la apoptosis desencadenada por calpaína en células.

---

<sup>114</sup> Donkor, I. O. *Expert Opin. Ther. Patents* **2011**, 21, 601 – 636.

<sup>115</sup> Donkor, I. O. *Expert Opin. Ther. Patents* **2015**, 25, 17 – 31.

<sup>116</sup> Donkor, I. O. *Curr Med Chem.* **2000**, 7, 1171 – 1188.

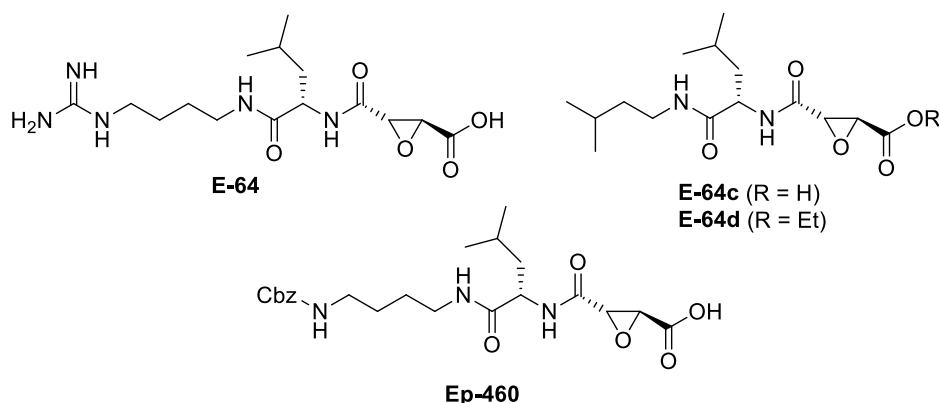
<sup>117</sup> (a) Maki, M.; Bagci, H.; Hamaguchi, K.; Ueda, M.; Murachi, T.; Hatanaka, M. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 18866 – 18869. (b) Popp, O.; Heidinger, M.; Ruiz-Heinrich, L.; Ries, C.; Jochum, M; Gil-Parrado, S. *Biol. Chem.* **2003**, 384, 951 – 958.

<sup>118</sup>  $K_i$  = constante de disociación del complejo enzima-inhibidor. Cuanto menor sea el valor de esta constante, mayor será la potencia de inhibición.

<sup>119</sup> Gil-Parrado, S.; Assfalg-Machleidt, I.; Fiorino, F.; Deluca, D.; Pfeiler, D.; Schaschke, N.; Moroder, L.; Machleidt, W. *Biol. Chem.* **2003**, 384, 395 – 402.

### A.2. Peptidil epóxidos<sup>86</sup>

Son inhibidores no selectivos que actúan mediante una alquilación irreversible del grupo tiol de la Cys del sitio activo. El primer inhibidor de este tipo fue el **E-64**,<sup>116</sup> cuya baja permeabilidad celular fue corregida mediante la sustitución de la guanidina por un resto alquilo para dar el compuesto **E-64c**,<sup>120</sup> suministrado en forma de su éster etílico, el profármaco **E-64d**, que presenta una mejor absorción. La incorporación de un grupo lipofílico en el extremo *N*-terminal, (p.e. Cbz, presente en el inhibidor **Ep-460**)<sup>121</sup> mejoró tanto la potencia como la permeabilidad celular de **E-64** (Figura 3.6).



**Figura 3.6.** Inhibidores de calpaína con estructura de peptidil epóxidos.

A pesar de su problemático perfil ADMET,<sup>122</sup> estos compuestos presentan interés como agentes terapéuticos y han sido estudiados clínicamente.<sup>123</sup> **E-64c** y **E-64d** proporcionan neuroprotección en daños en la médula ósea e isquemia cerebral,<sup>124</sup> **E-64**, **E-64c** y **E-64d** reducen la opacidad nuclear y la proteólisis de cristalinós en modelos de

<sup>120</sup> Claveau, D.; Riendeau, D.; Mancini, J. A. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 759 – 769.

<sup>121</sup> Pfizer, J. M.; Assfalg-Machleidt, I.; Machleidt, W.; Moroder, L.; Schaschke, N. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2007**, *13*, 93 – 104.

<sup>122</sup> **ADMET** (Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad). Término utilizado en farmacocinética y farmacología para describir la disposición de un fármaco en el organismo.

<sup>123</sup> Satoyashi, E. *Intern. Med.* **1992**, *31*, 841 – 846.

<sup>124</sup> Tsubokawa, T.; Yamaguchi-Okada, M.; Calvert, J. W.; Solaroglu, I.; Shimamura, N.; Yata, K.; Zhang, J. H. *J. Neurosci. Res.* **2006**, *84*, 832 – 840.

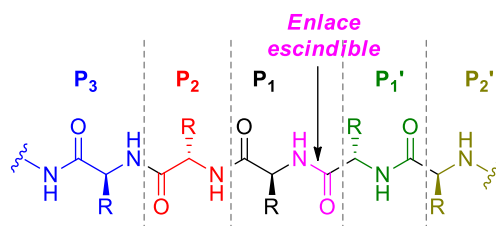
cataratas, y **E-64d** reduce la degeneración y la distrofia muscular en ratones, y ha mostrado una eficacia excelente en ratones con Alzheimer.<sup>125</sup>

Cuerrier *et al.*<sup>126</sup> realizaron una exploración sobre una quimioteca de epóxidos para elucidar la preferencia de aminoácidos en cada posición por el sitio activo de las calpaínas 1 y 2, y determinaron que los residuos preferidos son L-leucina y L-valina en P<sub>2</sub><sup>127</sup> y L-triptófano y L-arginina en P<sub>3</sub> y P<sub>4</sub>.<sup>128</sup> Este estudio permitió el desarrollo de la serie WRX de inhibidores de la calpaína, cuyos miembros presentan cierta selectividad frente a la calpaína 1 respecto a la 2 (3-6 veces más activos para CAPN1) así como una selectividad significativa sobre las catepsinas. Un ejemplo de esta serie lo constituye el inhibidor **WRH(R,R)**, específico de calpaínas, que inactiva de forma irreversible las calpaínas 1 y 2.<sup>126</sup> Recientemente, Schiefer *et al.*<sup>129</sup> han sintetizado una serie de compuestos con una potencia y permeabilidad mejorada, selectivos frente a la calpaína 1 al incorporar en la posición P<sub>2</sub> un grupo tiazolilo (p.e. compuesto **I**, **Figura 3.7**).

<sup>125</sup> Trinchese, F.; Fa, M.; Liu, S.; Zhang, H.; Hidalgo, A.; Schmidt, S. D.; Yamaguchi, H.; Yoshii, N.; Mathews, P. M.; Nixon, R. A.; Arancio, O. *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 2796 – 2807.

<sup>126</sup> Cuerrier, D.; Moldoveanu, T.; Campbell, R. L.; Kelly, J.; Yoruk, B.; Verhelst, S. H. L. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 9600 – 9611.

<sup>127</sup> **Nomenclatura proteasa-sustrato:** fue introducida por Schechter y Berger<sup>127</sup> en 1967. Se consideran los residuos de aminoácido del sustrato (P) que se unen a subsitios (S) a ambos lados del sitio activo de la enzima, teniendo en cuenta que cada subsitio permite la ubicación de un residuo de aminoácido, y se numeran a partir del punto de escisión/interacción con el sitio activo, en dirección al extremo N-terminal S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, etc. y hacia el C-terminal S<sub>1</sub>', S<sub>2</sub>', etc. Los residuos se numeran de forma análoga, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, en dirección al extremo N-terminal, y P<sub>1</sub>', P<sub>2</sub>', etc. hacia el C-terminal. Schechter, I.; Berger, A. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1967**, *27*, 157 – 162.



<sup>128</sup> Siklos, M.; BenAissa, M.; Thatcher, G. R. J. *Acta Pharm. Sin. B* **2015**, *5*, 506 – 519.

<sup>129</sup> Schiefer, I. T.; Tapadar, S.; Litosh, V.; Marton Siklos, M.; Scism, R.; Wijewickrama, G. T.; Chandrasena, E. P.; Sinha, V.; Tavassoli, E.; Brunsteiner, M.; Fa', M.; Arancio, O.; Petukhov, P.; Thatcher, G. R. J. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6054 – 6068.



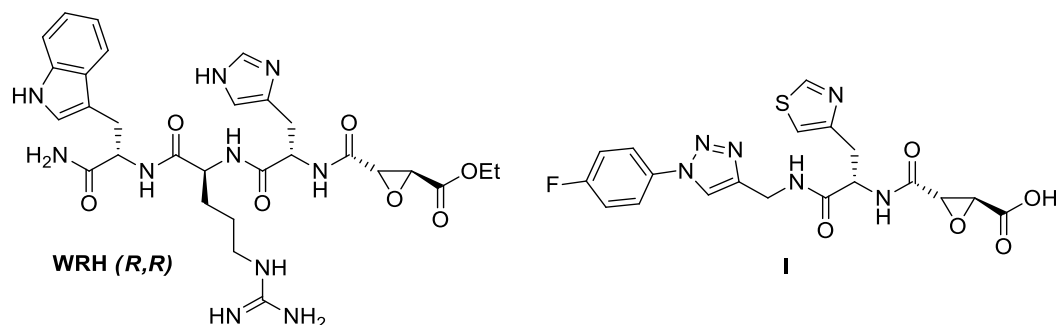


Figura 3.7. Peptidil epóxidos WRH (R,R) y I.

### A.3. Peptidil aldehídos

Son inhibidores reversibles que forman un enlace covalente con el residuo Cys en el sitio activo, generando un hemitioacetal.<sup>130</sup> Su miembro típico es la leupeptina, un potente inhibidor de las calpaínas 1 y 2<sup>131</sup> que inhibe la degeneración muscular en ratones y ha mostrado propiedades neuroprotectoras en modelos animales de isquemia transitoria y enfermedades de la médula espinal. Sin embargo, presenta una baja permeabilidad celular, derivada de la presencia de un resto de guanidina, por lo que se han llevado a cabo modificaciones estructurales para solventar este inconveniente. La calpeptina presenta un grupo alquilo en lugar del resto de guanidina, e incluye un grupo carbamato en su estructura. Inhibe las calpaínas 1 y 2, y ha sido ensayado en modelos de daño medular e isquemia, evitando la muerte celular en ambos casos.<sup>132</sup> Los compuestos **MDL-28170** y **SJA-6017** también resultaron buenos inhibidores de las calpaínas 1 y 2. Ambos muestran propiedades neuroprotectoras en modelos animales de isquemia cerebral<sup>133</sup> y Parkinson,<sup>134,135</sup> y **SJA-6017** resulta efectivo en la prevención de

<sup>130</sup> Moldoveanu, T.; Campbell, R. L.; Cuerrier, D.; Davies, P. L. *J. Mol. Biol.* **2004**, *343*, 1313 – 1326.

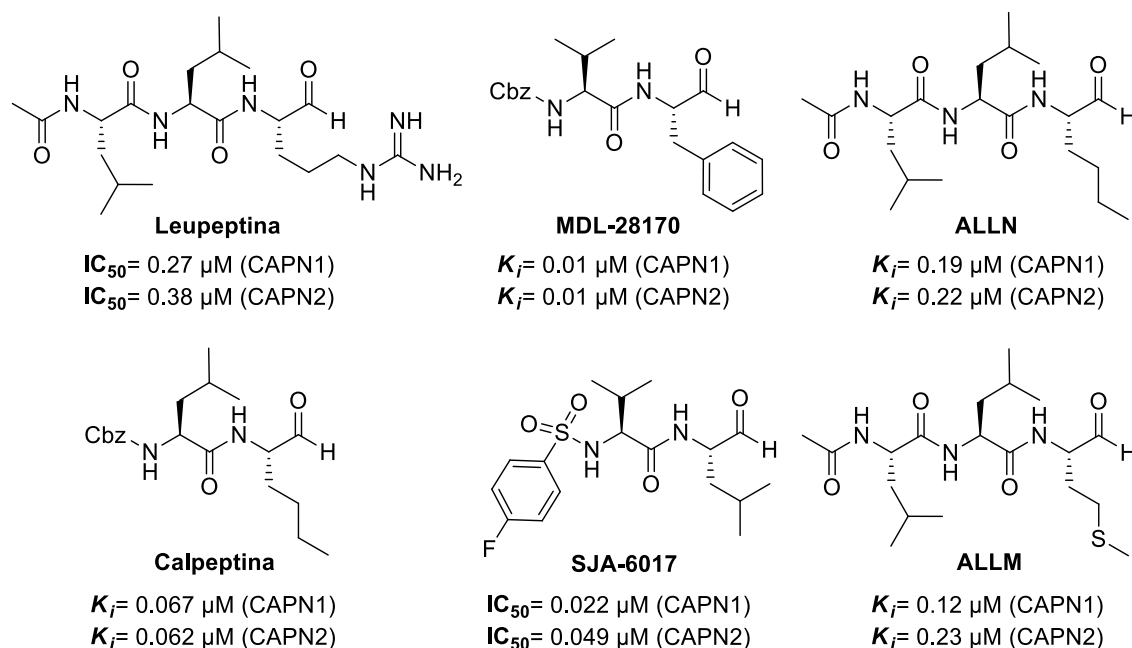
<sup>131</sup> Saito, K.; Nixon, R. A. *Neurochem. Res.* **1993**, *18*, 231 – 233.

<sup>132</sup> (a) Ray, S. K.; Karmakar, S.; Nowak, M. W.; Banik, N. L. *Neuroscience* **2006**, *139*, 577 – 595. (b) Das, A.; Garner, D. P.; Del Re, A. M.; Woodward, J. J.; Kumar, D. M.; Agarwal, N.; Banik, N. L.; Ray, S. K. *Brain Res.* **2006**, *1084*, 146 – 157. (c) Peng, S.; Kuang, Z.; Zhang, Y.; Xu, H.; Cheng, Q. *Mol. Biol. Rep.* **2011**, *38*, 905 – 912.

<sup>133</sup> Kawamura, M.; Nakajima, W.; Ishida, A.; Ohmura, A.; Miura, S.; Takada, G. *Brain Res.* **2005**, *1037*, 59 – 69.

### 3.1. Antecedentes

cataratas,<sup>136</sup> y muestra propiedades cardioprotectoras.<sup>137</sup> También pertenecen a este grupo los tripéptidos **ALLN** (Ac-Leu-Leu-Nle-H) y **ALLM** (Ac-Leu-Leu-Met-H), capaces de disminuir la expansión de células tumorales y aumentar la apoptosis de las mismas.<sup>138</sup>



**Figura 3.8.** Inhibidores de calpaína con estructura de peptidil aldehídos.

<sup>134</sup> Crocker, S. J.; Smith, P. D.; Jackson-Lewis, V.; Lamba, W. R.; Hayley, S. P.; Grimm, E.; Callaghan, S. M.; Slack, R. S.; Melloni, E.; Przedborski, S.; Robertson, G. S.; Anisman, H.; Merali, Z.; Park, D. S. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 4081 – 4091.

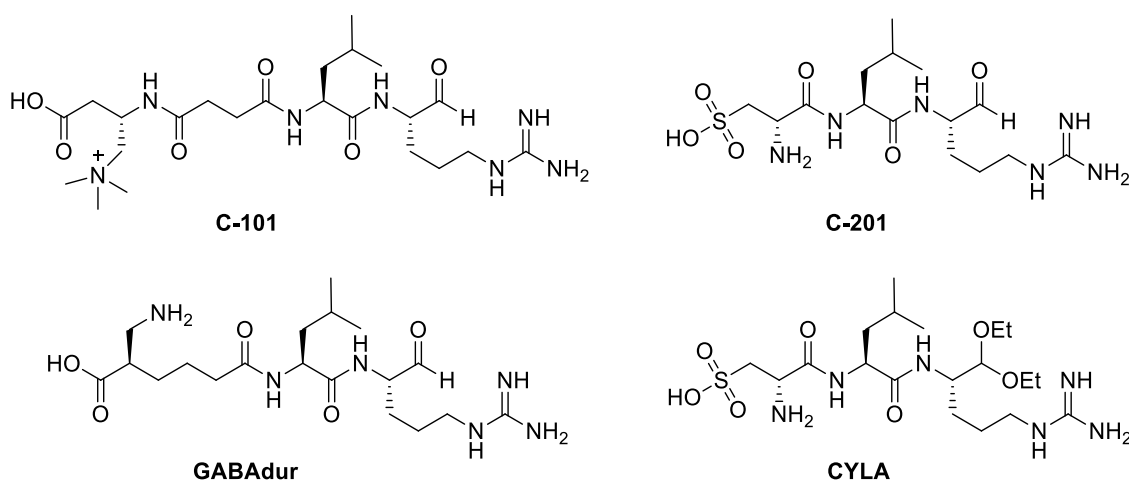
<sup>135</sup> (a) Koumura, A.; Nonaka, Y.; Hyakkoku, K.; Oka, T.; Shimazawa, M.; Hozumi I.; Inuzuka, T.; Hara, H. *Neuroscience* **2008**, *157*, 309 – 318. (b) Knaryan, V. H.; Samantaray, S.; Park, S.; Azuma, M.; Inoue, J.; Banik, N. L. *J. Neurochem.* **2014**, *130*, 280 – 290.

<sup>136</sup> Biswas, S.; Harris, F.; Singh, J.; Phoenix, D. A. *Mol. Cell. Biochem.* **2004**, *261*, 169 – 173.

<sup>137</sup> (a) Yoshikawa, Y.; Zhang, G. X.; Obata, K.; Ohga, Y.; Matsuyoshi, H.; Taniguchi, S.; Takaki, M. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2010**, *298*, H643 – H651. (b) Takeshita, D.; Tanaka, M.; Mitsuyama, S.; Yoshikawa, Y.; Zhang, G. X.; Obata, K.; Ito, H.; Taniguchi, S.; Takaki, M. *J. Physiol. Sci.* **2013**, *63*, 113 – 123.

<sup>138</sup> Zhu, H.; Zhang, L.; Huang, X.; Davis, J. J.; Jacob, D. A.; Teraishi, F.; Chiao, P.; Fang, B. *Mol. Ther.* **2004**, *9*, 666 – 673.

El inhibidor **C-101** (*myodur*), constituido por una leupeptina modificada unida a una carnitina (molécula que se dirige de forma eficiente al músculo esquelético donde se encuentra su receptor) supone una aproximación importante a la distribución efectiva de un fármaco en células musculares aprovechando la interacción ligando-receptor.<sup>139</sup> Los inhibidores **C-201**<sup>140</sup> (*neurodur*) y **GABA<sub>dur</sub>**,<sup>141</sup> se unen a taurina o pregabalina (fármaco antiepiléptico) con el objetivo de inducir neuroprotección. El profármaco **CYLA** mostró prevención del daño axonal en ratones con esclerosis múltiple<sup>142</sup> y prevención de la degeneración de células de la retina en isquemia retinal.<sup>143</sup>



**Figura 3.9.** Otros inhibidores de calpaína con estructura de peptidil aldehídos.

<sup>139</sup> Stracher, A.; Kesner, L.; Barton, N. W.; Carver, T. E. *Compounds and kits for treating muscle disorders and methods of use thereof*. WIPO patent **2005**, WO2005124563.

<sup>140</sup> Stracher, A.; Kesner, L.; Carver, T. E.; Barton, N. W. *Compounds for treating neurologic diseases, otologic diseases, or ophthalmologic diseases and methods of use thereof*. US patent **2005**, US20080200399.

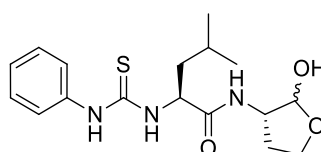
<sup>141</sup> Stracher, A.; Kesner, L.; Shulman, A. *Targeted delivery of pharmaceutical compounds*. US patent **2007**, US8729024.

<sup>142</sup> Hassen, G. W.; Feliberti, J.; Kesner, L.; Stracher, A.; Mokhtarian, F. *Brain Res.* **2008**, 1236, 206 – 215.

<sup>143</sup> David, J. S.; Melamud, A.; Kesner, L.; Roth, S.; Rosenbaum, P. S.; Barone, F. C.; Popp, S.; Hassen, G. W.; Stracher, A.; Rosenbaum, D. M. *Neuroreport* **2011**, 22, 633 – 636.

#### A.4. Peptidil hemiacetales

Para mejorar las características farmacocinéticas de los peptidil aldehídos, se han diseñado inhibidores en los que este grupo se encuentra protegido en forma de hemiacetal cíclico, que presentan mejoras en la permeabilidad celular y la estabilidad metabólica. Un ejemplo de ello es el compuesto **SNJ-1715**, que presenta una buena actividad inhibitoria, absorción, biodisponibilidad oral y una semivida prolongada, y resulta eficaz contra las cataratas inducidas por calcio.<sup>144</sup> (**Figura 3.16**).



**SNJ-1715**

$IC_{50}$  = 0.086  $\mu$ M (CAPN1)

$IC_{50}$  = 1.9  $\mu$ M (CAPN2)

**Figura 3.10.** Inhibidores de calpaína con estructura de peptidil hemiacetal.

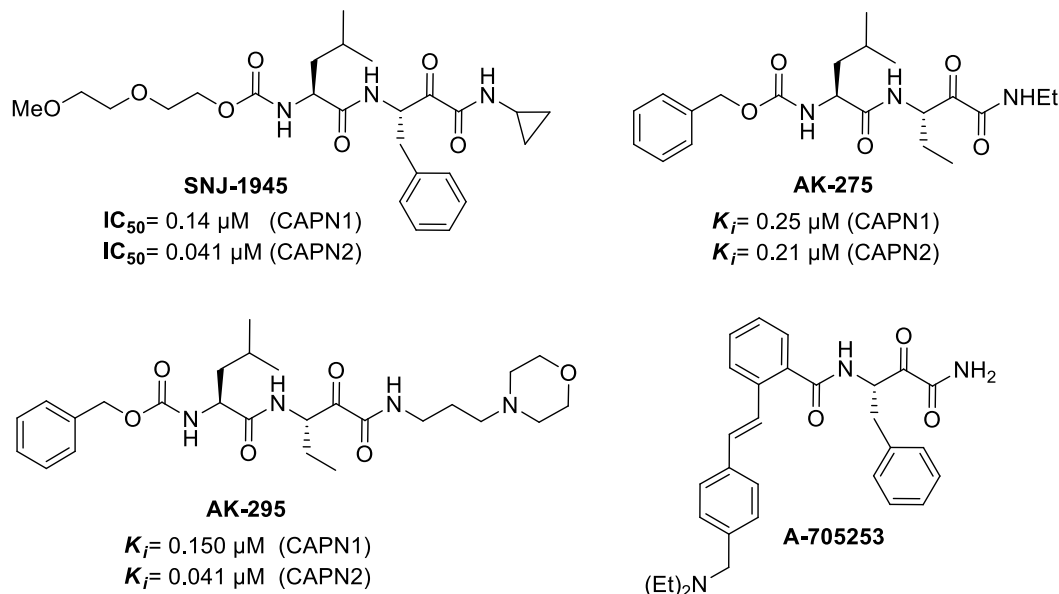
#### A.5. Peptidil $\alpha$ -cetocarbonilos

Son inhibidores reversibles de calpaína, con una mejor permeabilidad celular y estabilidad metabólica que los aldehídos. Como ejemplo, en la **Figura 3.11** se muestran los inhibidores **SNJ-1945**, **AK-275** y **AK-295**, que muestran efectos neuroprotectores frente a daños cerebrales en modelos de isquemia en animales.<sup>145</sup> El inhibidor **SNJ-1945** presenta buena biodisponibilidad oral y penetración retinal, y **AK-295** inhibe el desarrollo de cataratas *in vitro*. El inhibidor **A-705253**, con un grupo amino básico, muestra mejoras en la solubilidad en agua, permeabilidad celular, estabilidad metabólica

<sup>144</sup> Shirasaki, Y.; Nakamura, M.; Yamaguchi, M.; Miyashita, H.; Sakai, O.; Inoue, J. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3926 – 3932.

<sup>145</sup> Bartus, R. T.; Hayward, N. J.; Elliott, P. J.; Sawyer, S. D.; Baker, K. L.; Dean, R. L.; Akiyama, A.; Straub, J. A.; Harbeson, S. L.; Li, Z.; Powers, J. *Stroke* **1994**, *25*, 2265 – 2270.

y disponibilidad oral.<sup>146</sup> Además, muestra propiedades cardioprotectoras asociadas con la inhibición de la calpaína en un modelo porcino con isquemia miocárdial.<sup>100</sup>



**Figura 3.11.** Inhibidores de calpaína con estructura de peptidil  $\alpha$ -cetoamida.

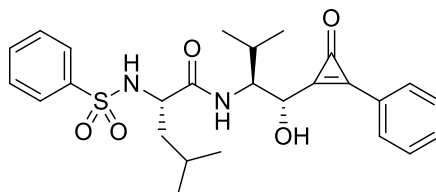
### A.6. Ciclopropenonas

Son inhibidores covalentes reversibles, y su representante principal es el compuesto **BDA-410** (Figura 3.12), que presenta cierta selectividad frente a CAPN1 respecto a CAPN2 [ $IC_{50} = 130$  nM (CAPN1); 630 nM (CAPN2)]<sup>147</sup> aunque también inhibe otras cisteín proteasas. **BDA-410** tiene buena biodisponibilidad oral, muestra

<sup>146</sup> Neuhof, C.; Fabiunke, V.; Deibele, K.; Speth, M.; Moeller, A.; Lubisch, W.; Fritz, H.; Tillmanns, H.; Neuhof, H. *Biol. Chem.* **2004**, 385, 1077 – 1082.

<sup>147</sup> Ando, R.; Sakaki, T.; Morinaka, Y.; Takahashi, C.; Tamao, Y.; Yoshii, N.; Katayama, S.; Saito, K.; Tokuyama, H.; Isaka, M.; Nakamura, E. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 571 – 579.

efectos neuroprotectores en modelos de ratones con Alzheimer,<sup>148</sup> y bloquea el crecimiento del *Plasmodium falciparum* tanto *in vitro* como *in vivo* en ratones.<sup>149</sup>

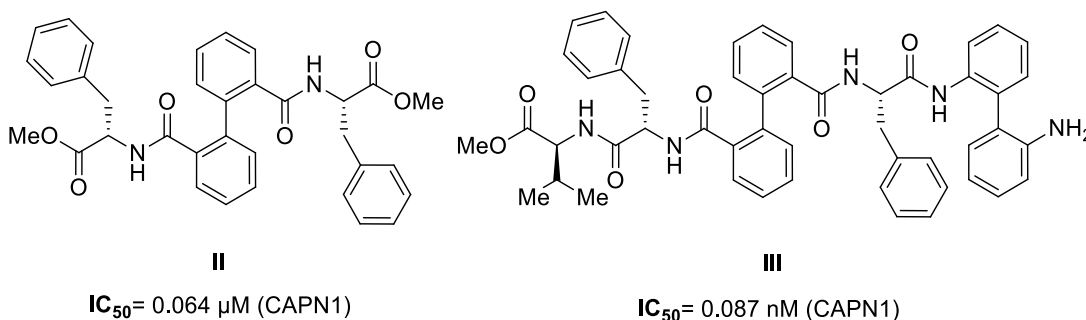


BDA-410

**Figura 3.12.** Inhibidores de calpaína con estructura de ciclopropenona.

### A.7. Híbridos péptido-aromático/heteroaromático

Pertenecen a este grupo los híbridos bifenil-péptido **II** y **III** (**Figura 3.13**), inhibidores de calpaína potentes y selectivos<sup>150</sup> que no presentan citotoxicidad y muestran actividad citoprotectora en cultivos celulares. No se unen directamente al sitio activo de la calpaína, sino que interaccionan con  $\text{Ca}^{2+}$  para modular su actividad.



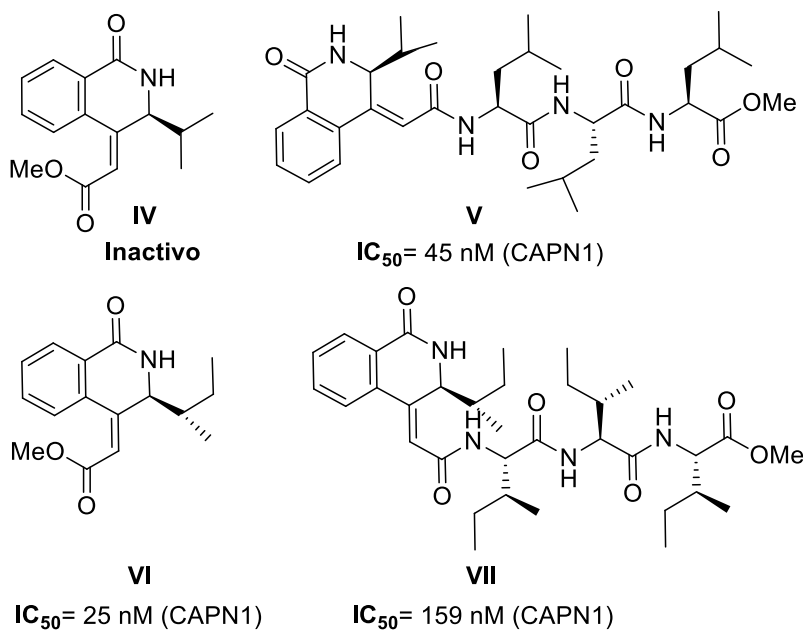
**Figura 3.13.** Híbridos péptido-aromático/heteroaromático como inhibidores de calpaína.

<sup>148</sup> Battaglia, F.; Trinchese, F.; Liu, S. M.; Walter, S.; Nixon, R. A.; Arancio, O. *J. Mol. Neurosci.* **2003**, *20*, 357 – 362.

<sup>149</sup> Li, X.; Chen, H.; Jeong, J.-J.; Chishti, A. H. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2007**, *155*, 26 – 32.

<sup>150</sup> (a) Montero, A.; Mann, E.; Chana, A.; Herradon, B. *Chem. Biodivers.* **2004**, *1*, 442 – 457. (b) Montero, A.; Alonso, M.; Benito, E.; Chana, A.; Mann, E.; Navas, J. M.; Herradon, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2753 – 2757.

Los híbridos péptido-heterociclo mostrados en la **Figura 3.14**, en los que el heterociclo es un derivado de isoquinolina,<sup>151</sup> mostraron una mejora considerable en la actividad inhibitoria al sustituir el grupo isopropilo por un grupo *sec*-butilo (**VII**),<sup>152</sup> siendo activo incluso el heterociclo sin un péptido acoplado a su estructura (**VI**).



**Figura 3.14.** Híbridos péptido-heterociclo como inhibidores de calpaína.

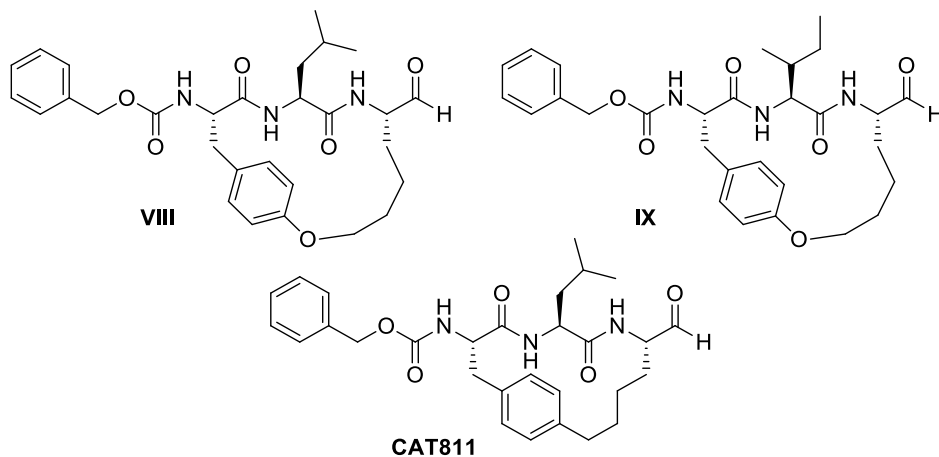
### A.8. Macrociclos peptidomiméticos

La introducción de elementos de restricción a un péptido da lugar a derivados con conformaciones bien definidas tales como hélices  $\alpha$  o giros  $\beta$ , que permiten mejorar las propiedades farmacocinéticas, así como la selectividad al mimetizar la conformación de la calpastatina en zonas de unión a la calpaína. En la **Figura 3.15** se muestran algunos macrociclos con conformación de giro beta y buena selectividad frente a CAPN2. El macrociclo **CAT811**, presenta además cierta especificidad para CAPN2 respecto a

<sup>151</sup> Mann, E.; Chana, A.; Sanchez-Sancho, F.; Puerta, C.; Garcia-Merino, A.; Herradon, B. *Adv. Synth. Catal.* **2002**, 344, 855 – 867.

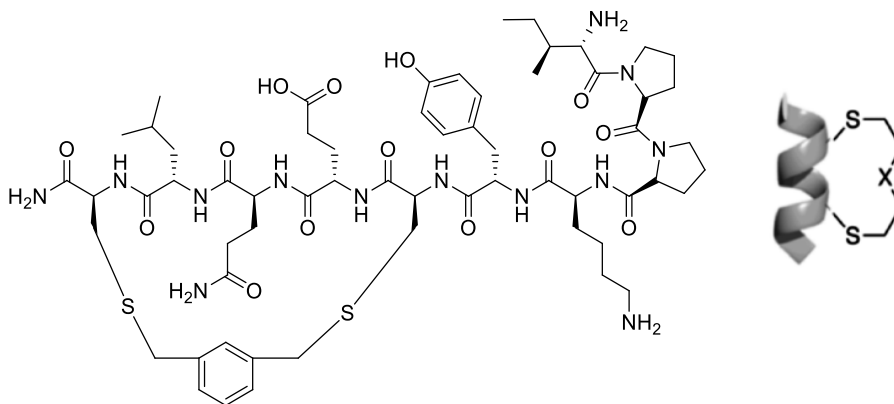
<sup>152</sup> Herradon, B.; Chicharro, R.; Aran, V. J.; Alonso, M. *PCT Int. Appl.* **2006**, WO 2006064075 A1 20060622.

CAPN1 ( $IC_{50} = 30$  nM (CAPN2), 220 nM (CAPN1))<sup>106</sup> siendo inactivo frente a otras proteasas, y ralentiza las cataratas corticales hereditarias en modelos ovinos.<sup>107</sup>



**Figura 3.15.** Inhibidores de calpaína con estructura macrocíclica de giro  $\beta$ .

En la **Figura 3.16** se muestra un inhibidor macrocíclico  $\alpha$ -helicoidal selectivo de calpaínas,<sup>113,153</sup> que incorpora un grupo xilileno como espaciador (*linker*) de unión entre dos residuos de cisteína dentro del mismo péptido.



**Figura 3.16.** Inhibidor de calpaína con estructura macrocíclica  $\alpha$ -helicoidal.

<sup>153</sup> Greenbaum DC. *Novel  $\alpha$ -helical peptidomimetic inhibitors and methods using same* **2013**, WO163567; 2013.

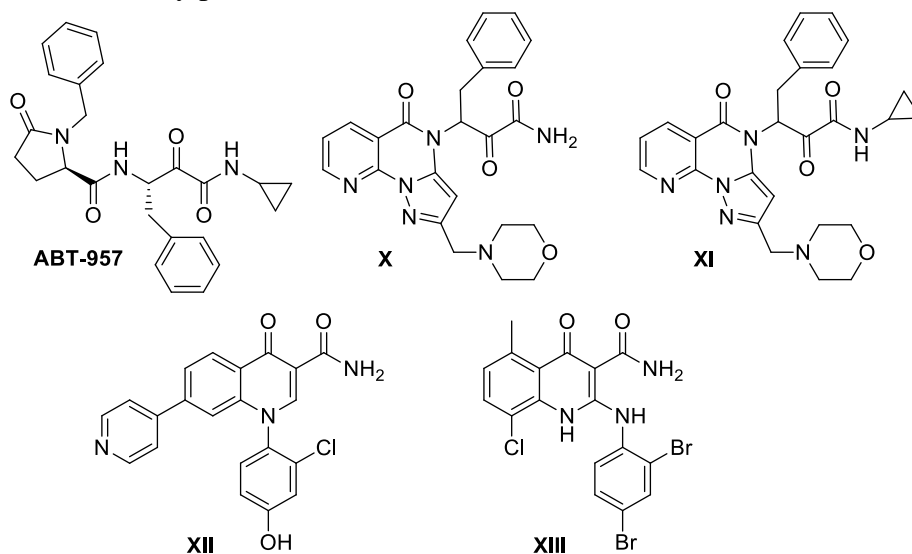


### A) Inhibidores no peptídicos

La naturaleza peptídica de los inhibidores peptidomiméticos los convierte en moléculas susceptibles a la degradación por proteinasas y su polaridad les confiere un perfil farmacocinético poco adecuado, que unido a su falta de selectividad limita su uso terapéutico.<sup>114</sup> Con el objetivo de evitar estas limitaciones, se comenzaron a sintetizar inhibidores de carácter no peptídico, reversibles, que por lo general se unen a una región alostérica de la calpaína, induciendo modificaciones en su estructura que afectan a la disposición conformacional requerida para su activación. A continuación se presentan algunos de los ejemplos más relevantes de este tipo de inhibidores.

#### B.1. Carboxamidas

Los Laboratorios Abbott<sup>154</sup> sintetizaron una serie de inhibidores con estructura carboxamida, selectivos frente a calpaínas respecto a algunas catepsinas. Como ejemplos, se pueden destacar el compuesto **ABT-957** (*Alicapistat*), que llegó a la fase 1 de ensayos sobre pacientes con Alzheimer, y los inhibidores **X** y **XI**, con mejor estabilidad citosólica y potencia inhibitoria.



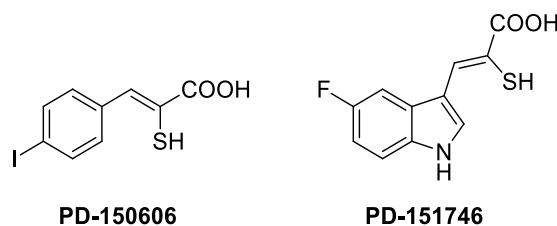
**Figura 3.17.** Inhibidores no peptídicos con estructura carboxamida.

<sup>154</sup> Abbott Laboratories. *Carboxamide compounds and their use as calpain inhibitors* **2012**, US8283363.

Las quinolin-carboxamidas **XII**<sup>155</sup> y **XIII**<sup>156</sup> (**Figura 3.17**) inhiben calpaína 1 en el rango  $\mu\text{M}$  y presentan cierta selectividad frente a otras cisteín proteasas.

### B.2. Ácidos $\alpha$ -mercaptoacrílicos

Los ácidos  $\alpha$ -mercaptoacrílicos **PD-150606** y **PD-151746** son inhibidores selectivos de isoforma que se unen al dominio PEF(S) de la subunidad pequeña, presentando actividad inhibitoria frente a CAPN1 [**PD-150606**:  $K_i = 0.21 \mu\text{M}$  (CAPN1),  $0.37 \mu\text{M}$  (CAPN2) y **PD-151746**:  $K_i = 0.26 \mu\text{M}$  (CAPN1),  $5.3 \mu\text{M}$  (CAPN2)]. Su inhibición es acompetitiva, el anillo aromático se une al bolsillo hidrofóbico donde se alojan residuos del subdominio C de la calpastatina. Presentan buena permeabilidad celular y potencial terapéutico en el tratamiento de daños celulares, y disminuyen la apoptosis inducida por calpaína en cultivos celulares.<sup>157</sup> **PD-150606** tiene además efectos neuroprotectores<sup>158</sup> y reduce el daño renal mediante su administración en modelos de ratones.<sup>159</sup>



**Figura 3.18.** Ácidos  $\alpha$ -mercaptoacrílicos **PD-150606** y **PD-151746**.

Tomando estos compuestos como *hits*, Adams *et al.*<sup>160</sup> sintetizaron una serie de compuestos, siendo **XIV** el más activo de la serie (**Figura 3.19**), así como dímeros

<sup>155</sup> Graybill, T. L.; Dolle, R. E.; Osifo, I. K.; Schmidt, S. J.; Gregory, J. S.; Harris, A. L.; Miller, M. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 387 – 392.

<sup>156</sup> Kang, D.; Jun, K.; Lee, J. P.; Pak, C. S.; Na, Y.; Kwon, Y. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 3093 – 3097.

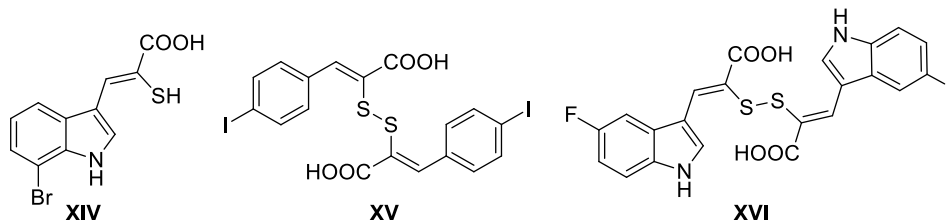
<sup>157</sup> Verdaguer, E.; Alvira, D.; Jimenez, A.; Rimbau, V.; Camins, A.; Pallas, M. *J. Pharmacol.* **2005**, 145, 1103 – 1111.

<sup>158</sup> Farkas, B.; Tantos, A.; Schlett, K.; Vilagi, I.; Friedrich, P. *Brain Res.* **2004**, 1024, 150 – 158.

<sup>159</sup> Chatterjee, P. K.; Todorovic, Z.; Sivarajah, A.; Mota-Filipe, H.; Brown, P. A. J.; Stewart, K. N.; Mazzon, E.; Cuzzocrea, S.; Thiemermann, C. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, 69, 1121 – 1131.

<sup>160</sup> Adams, S. E.; Robinson, E. J.; Miller, D. J.; Rizkallah, P. J.; Hallett, M. B.; Allemann, R. K. *Chem. Sci.* **2015**, 6, 6865 – 6871.

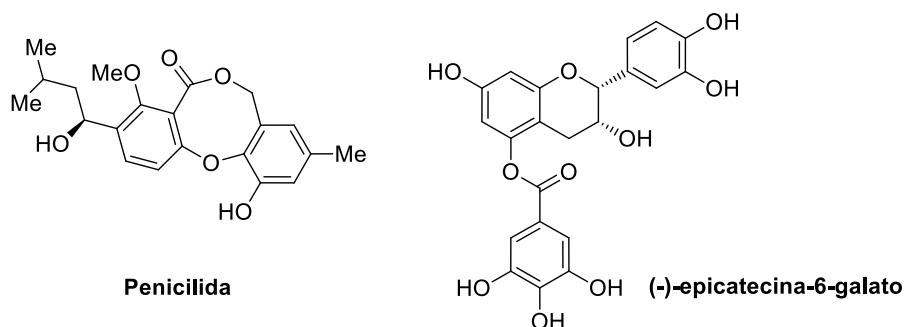
mediante la unión con un puente disulfuro (**XV**, **XVI**), que mostraron una mayor potencia inhibitoria y una interacción más estable con el dominio PEF(S).



**Figura 3.19.** Ácidos  $\alpha$ -mercaptoacrílicos como inhibidores de calpaína.

### B.3. Productos naturales

Algunos productos naturales han demostrado cierta inhibición frente a CAPN1, como es el caso de la penicilida, aislada de *Penicillium sp.*,<sup>161</sup> ( $IC_{50} = 7.1 \mu M$ ) y el (-)-epicatecina-6-galato, aislado de *Orostachys japonicus*,<sup>162</sup> ( $IC_{50} = 41 \mu M$ ).



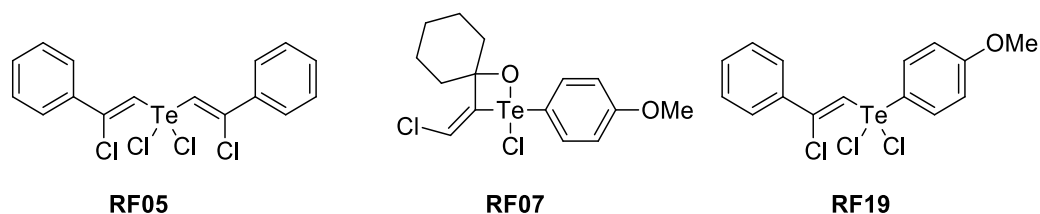
**Figura 3.20.** Productos naturales inhibidores de calpaína.

<sup>161</sup> Chung, M.; Lee, H.; Chun, H.; Kho, Y. *J. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, 8, 188 – 190.

<sup>162</sup> Kim, H. J.; Lee, J. Y.; Kim, S. M.; Park, D.-A. Jin, C.; Hong, S. P.; Kee, Y. S. *Fitoterapia* **2009**, 80, 73 – 76.

### B.4. Compuestos de organoteluro hipervalente

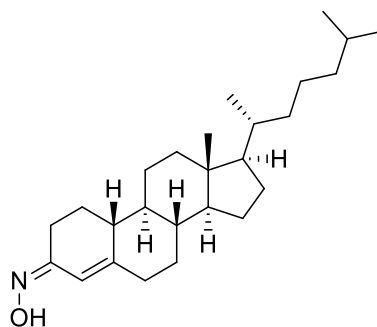
Los compuestos de organoteluro hipervalente **RF05**, **RF07** y **RF19** inhiben las calpaínas del *Plasmodium falciparum*, convirtiéndose en potenciales candidatos a fármacos pendientes de ser ensayados para evaluar su especificidad.<sup>163</sup>



**Figura 3.21.** Compuestos de organoteluro hipervalente como inhibidores de calpaína.

### B.5. Terpenoides

La olesoxima (**TRO19622**) es un fármaco experimental con propiedades neuroprotectoras, perteneciente a la familia de los moduladores de mitocondria, que ha sido ensayado como inhibidor de calpaínas en modelos de ratones con la enfermedad de Huntington,<sup>164</sup> y en ensayos de fase 2 sobre pacientes de atrofia muscular espinal está mostrando efectos beneficiosos en el mantenimiento de la función neuromuscular.



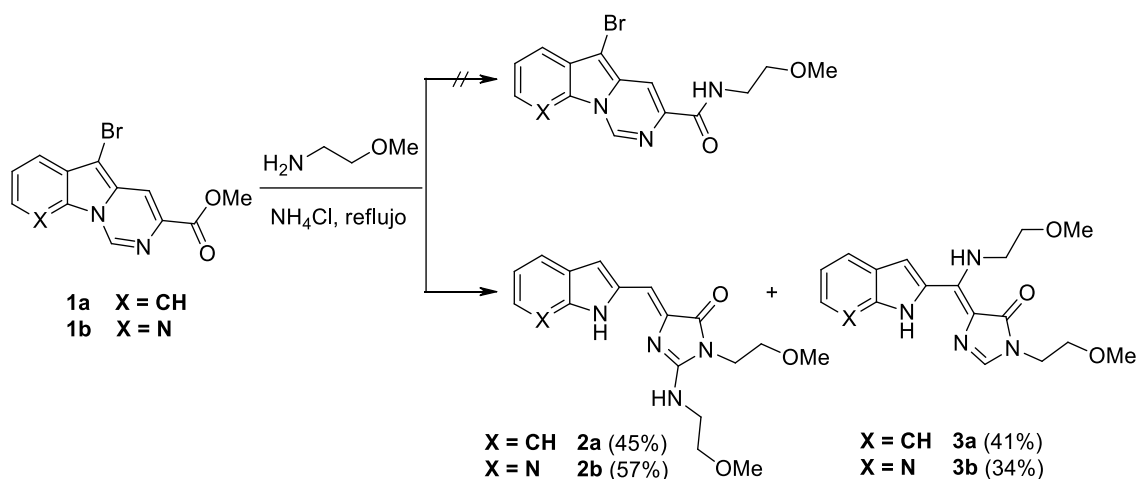
**Figura 3.22.** Olesoxima.

<sup>163</sup> El Chamy Maluf, S.; Melo, P. M. S.; Varotti, F. P.; Gazarini, M. L.; Cunha, R. L. O. R.; Carmona, A. K. *Parasitol. Int.* **2016**, 65, 20 – 22.

<sup>164</sup> Clemens, L. E.; Weber, J. J.; Wlodkowski, T. T.; Yu-Taeger, L.; Michaud, M.; Calaminus, C.; Eckert, S. H.; Gaca, J.; Weiss, A.; Magg, J. C.; Jansson, E. K.; Eckert, G. P.; Pichler, B. J.; Bordet, T.; Pruss, R. M.; Riess, O.; Nguyen, H. P. *Brain* **2015**, 138, 3632 – 3653.

### B.6. Derivados de azolometilen-5-azolona

En el contexto de la Red de Investigación Renal, en la Tesis Doctoral de la Dra. María Morón<sup>165</sup> realizada en el grupo de investigación se abordó la síntesis de nuevos inhibidores de calpaína del tipo híbrido péptido-heterociclo utilizando como heterociclos azolopirimidinas. Como ya se ha explicado en la introducción (páginas 8-10), junto a los híbridos se obtuvieron dos compuestos que se identificaron como los derivados de 2-indolilmetilenimidazolona **2a** y **3a** que se formaron en la reacción de **1a** con aminas primarias. Un comportamiento similar se observó a partir de la pirido[3',2':4,5]pirrolo[1,2-c]pirimidina **1b** obteniéndose las correspondientes 2-azaindolilmetilenimidazolonas.<sup>6</sup>



**Esquema 3.1.** Reacción cascada de derivados de pirimido[1,6-*a*]indol **1a** y pirido[3',2':4,5]pirrolo[1,2-*c*]pirimidina **1b** con 2-metoxietilamina.

La formación de los compuestos **2** y **3** se explicó a través del mecanismo que se detalla en el **Esquema 1.5** (página 10).

La mezcla de compuestos obtenidos **2/3** resultó activa frente a calpaína utilizando como sustrato indicador Suc-Leu-Tyr-AMC (*N*-Succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin). Después de la separación de ambos compuestos, los ensayos

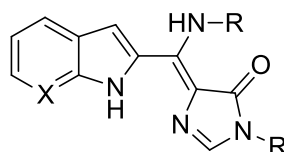
<sup>165</sup> Morón, M. *Tesis doctoral*, Universidad de Alcalá, **2012**.

### 3.1. Antecedentes

mostraron que **3a** y **3b**, en los que el grupo amino está unido al enlace exocíclico, se comportaban como inhibidores de calpaína, mientras que los compuestos **2a** y **2b** con el grupo amino unido al C2 de la imidazolona no resultaron activos.

Posteriormente se llevó a cabo la síntesis de una serie más amplia de análogos de **3a/3b** haciendo reaccionar distintas aminas con **1a/b**. Los productos obtenidos **3a-i** fueron sometidos al mismo ensayo para evaluar su actividad (**Tabla 3.2**).

**Tabla 3.2.** Inhibición e IC<sub>50</sub> de los compuestos **3a-i**.



Compuesto	R	X	Inhibición (%) <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>
<b>3a</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OMe	CH	73.7	0.46
<b>3b</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OMe	N	79.4	0.38
<b>3c</b>	HC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH	57.8	> 1
<b>3d</b>	HC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	N	37.2	---
<b>3e</b>	CH <sub>2</sub> Ph	CH	28.2	---
<b>3f</b>	CH <sub>2</sub> Ph	N	11.7	---
<b>3g</b>	Ciclohexil	CH	9	---
<b>3h</b>	Ciclohexil	N	4.5	---
<b>3i</b>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -	CH	14	---

<sup>a</sup>% Inhibición utilizando un extracto proteico. Referencia: calpeptina, 100% inhibición.

<sup>b</sup>IC<sub>50</sub> determinado utilizando un kit comercial para los compuestos con inhibición superior al 50% con el extracto proteico.

Tras este *screening* inicial realizado sobre un extracto proteico compuesto por una mezcla de calpaínas,<sup>166</sup> se seleccionaron aquellos derivados que mostraron mayor actividad, al menos un 50% tomando como referencia la calpeptina (100% inhibición), para efectuar un segundo test de inhibición, utilizando esta vez un kit comercial compuesto por calpaína 1 y calpaína 2. Los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos en este segundo estudio de inhibición también se muestran en la **Tabla 3.2**.

A modo de resumen de los datos recopilados en la **Tabla 3.2**, se observa que los derivados de indol muestran, en general, un mayor porcentaje de inhibición que los derivados de azaindol. Por otro lado, todas las aminas primarias estudiadas resultaron menos activas que la 2-metoxietilamina y únicamente los derivados de ésta, **3a** y **3b**, mostraron una actividad de inhibición prometedora, obteniéndose unos valores de IC<sub>50</sub> de 0.46 y 0.38  $\mu$ M, respectivamente, al medir la inhibición con el kit comercial.

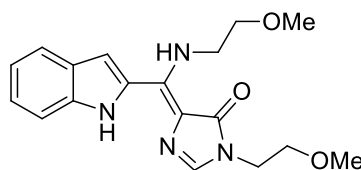
La actividad inhibitoria que mostraron los compuestos **3a** y **3b** y el potencial interés de los mismos como inhibidores no peptídicos que pudieran tener un mecanismo de inhibición alostérica, nos llevó a diseñar una ruta más eficiente para la obtención de esta familia de compuestos ya que en todos los casos se obtenían con rendimientos medios-bajos debido a la formación como productos secundarios (o principales) de los compuestos **2**. De esta forma, también podríamos tener acceso a un mayor número de análogos introduciendo diversidad estructural en el azol, la amina y la imidazolona y llevar a cabo un estudio de relación estructura-actividad (*structure-activity relationship*, SAR) con el objetivo de obtener compuestos con actividad mejorada respecto a **3a** y **3b**.

---

<sup>166</sup> Para más detalles, consultar el subapartado *Estudios de inhibición* de este capítulo.

## 3.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La actividad encontrada para los compuestos **3a** y **3b** indica que este último es ligeramente más activo ( $IC_{50} = 0.46 \mu M$  vs  $IC_{50} = 0.38 \mu M$ ), pero en el resto de los compuestos obtenidos los porcentajes de inhibición encontrados son mejores para los derivados de indol cuando se comparan con los de azaindol. Además, desde el punto de vista sintético se tienen más posibilidades de preparar derivados de indol a partir de productos comerciales. Por esta razón se eligió el derivado indólico **3a** como *hit*.



**Figura 3.23.** Compuesto **3a** (*hit*).

### 3.2.1. Diseño de una ruta sintética alternativa para los compuestos **3**

En base a los precedentes bibliográficos encontrados,<sup>167,168,169,170</sup> se diseñó una síntesis para los compuestos **3**, cuyo análisis retrosintético se detalla en el **Esquema 3.2**. Esta ruta sintética posibilitaría, además de la introducción de sustituyentes en el sistema indólico y la posición C2 de la imidazolona ( $R_2$ ), poder determinar de forma independiente la influencia en la actividad inhibitoria del grupo amino unido al enlace exocíclico ( $HNR_3$ ) y del sustituyente alquílico  $R_1$  unido al N1 de la imidazolona introduciendo de forma independiente ambos grupos en distintos pasos de la ruta.

<sup>167</sup> (a) Barros, T. G.; Pinheiro, S.; Williamson, J. S.; Tanuri, A.; Gomes, M. Jr.; Pereira, H. S.; Brindeiro, R. M.; Neto, J. B. A.; Antunes, O. A. C.; Muri, E. M. F. *Amino Acids* **2010**, 38, 701 – 709. (b) Bailly, F.; Queffelec, C.; Mbemba, G.; Mouscadet, J.-F.; Pommery, N.; Pommery, J.; Henichart, J.-P.; Cotellet, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, 43, 1222 – 1229. (c) He, X.; Bell, A. F.; Tonge, P. J. *Org. Lett.* **2002**, 4, 1523 – 1526.

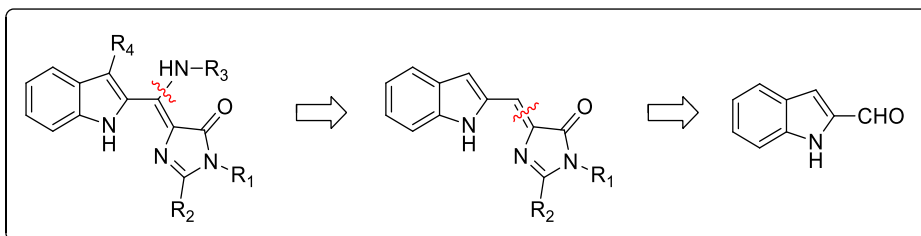
<sup>168</sup> (a) Dalla Croce, P.; La Rosa, C. *J. Chem. Res.* **1985**, 11, 360 – 361. (b) Shafi, P. M. *Curr. Sci.* **1985**, 54, 1231 – 1232.

<sup>169</sup> Kim, J. W.; Park, H. H.; Cha, Y. G.; Seo, I. T.; Jeon, T. H.; Jang, J. S.; Kim, S. H.; Yoo, H. C. *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo* **2009**, KR 2009085445 A 20090807.

<sup>170</sup> Bakulev, V. A.; Mokrushin, V. S.; Grishakov, A. N.; Pushkareva, Z. V. *Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinenii* **1982**, 957 – 962.



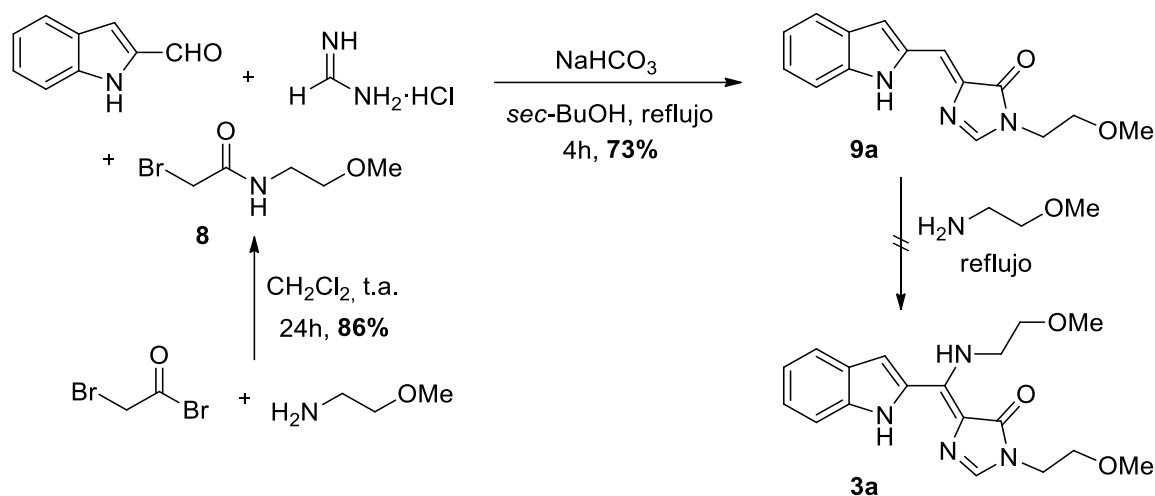
El paso clave de la reacción sería la funcionalización del doble enlace exocíclico mediante una reacción aza-Michael entre distintas aminas y la indolometilenimidazolona intermedia, la cual se sintetizaría previamente adaptando un procedimiento descrito en bibliografía<sup>168</sup> a partir de indol-2-carboxaldehído.



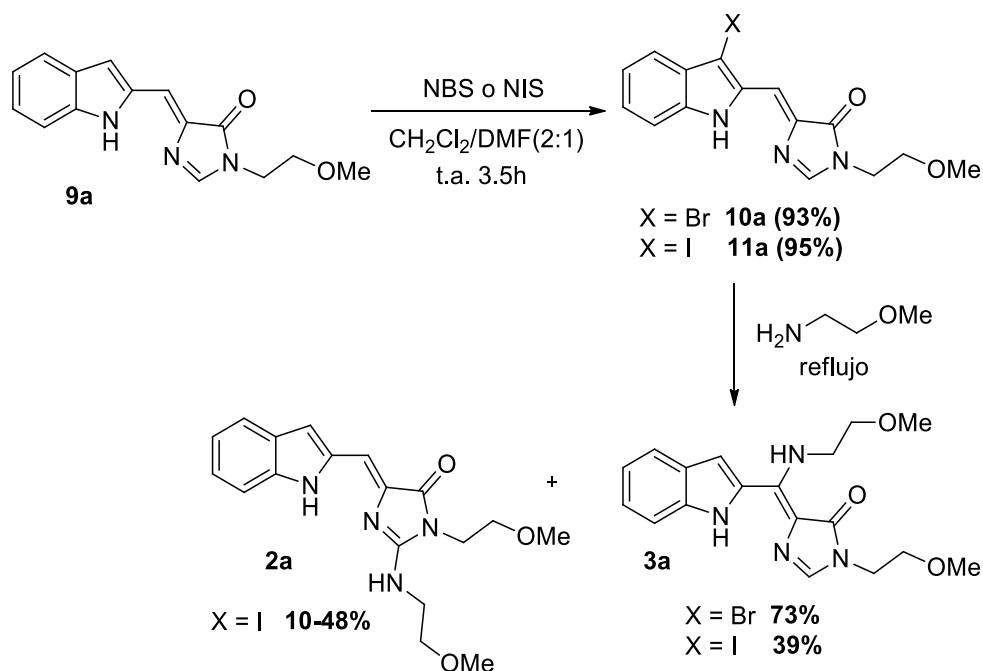
**Esquema 3.2.** Esquema retrosintético para los compuestos **3**.

Con intención de probar la validez de la ruta propuesta, se ensayó la síntesis del compuesto **3a** por esta vía. Para ello, se preparó la 2-bromo-*N*-(2-metoxietil)-acetamida **8** mediante una reacción entre bromuro de bromoacetilo y 2-metoxietilamina utilizando un procedimiento descrito en la bibliografía.<sup>171</sup> Después, se obtuvo el compuesto **9** mediante una reacción multicomponente entre el indol-2-carboxaldehído, clorhidrato de formamidina y la bromoacetamida **8**, utilizando como base bicarbonato de sodio. Por último, se hizo reaccionar **9** con 2-metoxietilamina, pero no tuvo lugar la esperada reacción de aza-Michael y se recuperó el producto de partida inalterado.

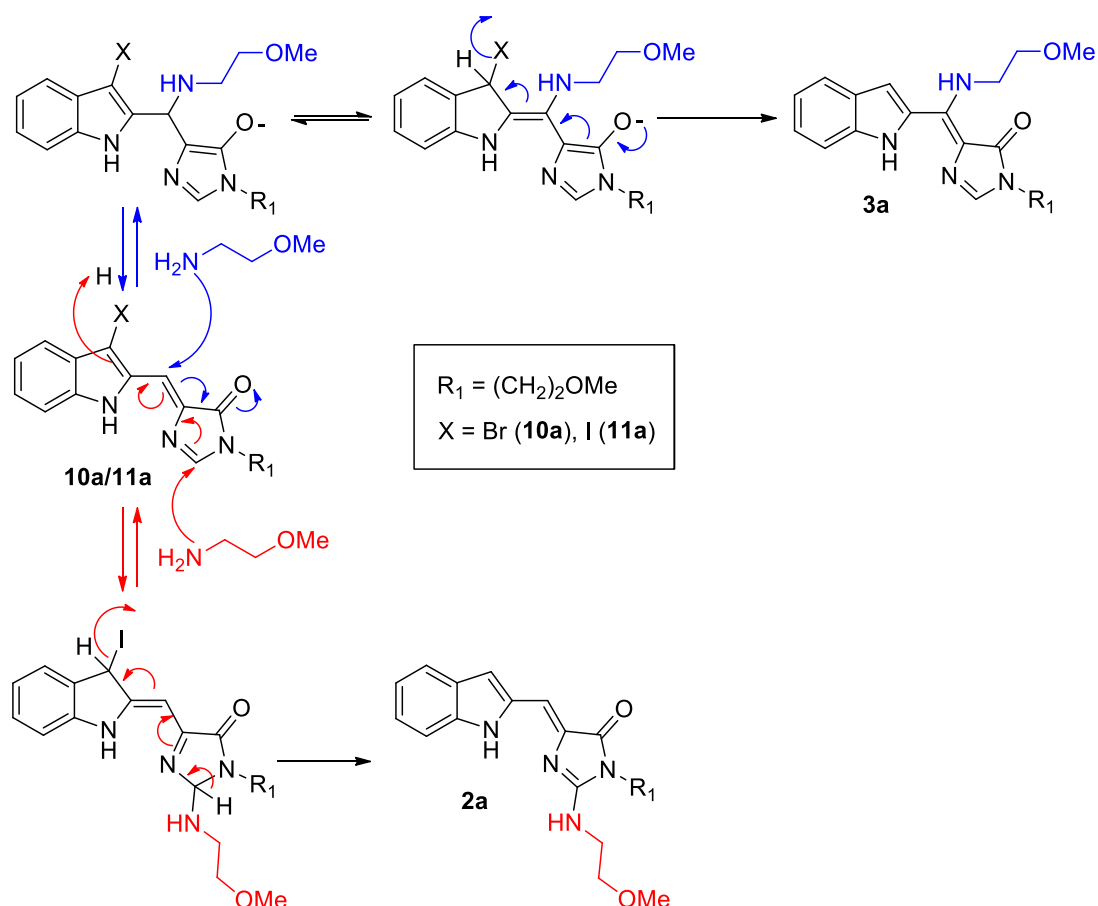
<sup>171</sup> Groves, J. T. PCT Int. Appl. **2008**, WO 2008094222.

Esquema 3.3. Síntesis de **3a** por reacción multicomponente.

Por lo tanto, hubo que buscar una alternativa que condujese al compuesto **3a**. En base a los resultados obtenidos con **1a** y **1b** en su reacción con aminas primarias, en los que se había observado que la presencia del átomo de bromo resultaba fundamental para la reacción de apertura del sistema tricíclico (**Esquema 1.5**), se pensó que se podría activar el carbono exocíclico que conecta los anillos de indol e imidazolona, facilitando así la reacción aza-Michael mediante la introducción de un halógeno en la posición C3 del indol. Para comprobar esta hipótesis, se trató el compuesto **9a** con *N*-bromo- y *N*-iodosuccinimidas (NBS y NIS), con lo que se obtuvieron los derivados **10a** y **11a** con rendimientos excelentes. Estos se hicieron reaccionar con 2-metoxietilamina, dando lugar, tal como esperábamos, a la formación del producto **3a**, si bien en el caso del derivado iodado **11a** también se obtuvieron cantidades variables del análogo del cromóforo de la GFP **2a**. De este modo, en este último paso, se produce la reacción aza-Michael de la amina sobre el intermedio halogenado **10a/11a** aunque con la eliminación concomitante del halógeno en la posición C3 del indol.

Esquema 3.4. Síntesis del compuesto **3a**.

La transformación de los derivados halogenados **10a** y **11a** en los compuestos **3a** y **2a** se puede racionalizar mediante la propuesta mecanística que se detalla en el **Esquema 3.5**. Esta implicaría el ataque competitivo de la amina a dos carbonos distintos en la molécula que presentan carácter electrófilo: el carbono exocíclico y el carbono C2 de la imidazolona. En ambos casos la formación del producto final requiere la eliminación del halógeno en la posición C3 del indol (bromo en el caso de **10a**, iodo para **11a**).



**Esquema 3.5.** Mecanismo propuesto para la formación de **3a/2a**. Ataque nucleófilo sobre el carbono exocíclico (azul) para dar **3a** y sobre el C2 de la imidazolona (rojo) para dar **2a**.

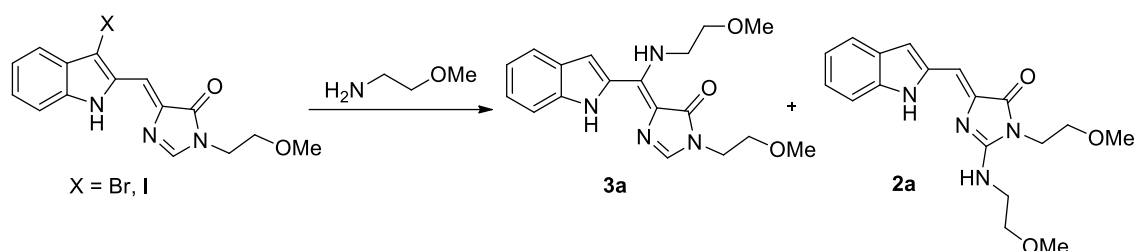
El ataque nucleófilo de la amina al carbono exocíclico de **10a** y **11a** *via* activación de esta posición mediante el halógeno en la posición C3 del indol y eliminación del halógeno es una reacción para la que no hemos encontrado precedentes en la química del indol y posibilita una ruta sintética eficiente para la obtención del compuesto **3a** y análogos. La metodología mejora de manera significativa la ruta previamente descrita en nuestro grupo de investigación para **3a** ya que éste se obtiene en tan solo 4 pasos y con un rendimiento global del 44% frente al 31% obtenido anteriormente en el mismo número de pasos. Por lo tanto, este procedimiento fue tomado como referencia para la

síntesis de nuevos compuestos de esta misma familia de potenciales inhibidores de calpaína.

Sin embargo, la ruta sintética tiene como inconveniente, al igual que en el método anterior, el uso de la amina como disolvente en el último paso. Con la 2-metoxietilamina este hecho no es relevante, ya que es un reactivo comercial de precio asequible y punto de ebullición elevado, pero estas características no son compartidas por otras aminas primarias y secundarias que podrían emplearse en el SAR. Por ello, se intentó la reacción utilizando disolventes habituales en presencia de un exceso de la amina. En la **Tabla 3.3** se muestran los experimentos realizados a este respecto utilizando *sec*-butanol como disolvente. Se seleccionó este disolvente en base a la buena solubilidad del compuesto en el mismo, así como su punto de ebullición, que permite llevar a cabo la reacción a temperaturas de 100–110 °C. Sin embargo, la reacción produjo únicamente la formación del subproducto **2a** en distintas condiciones. Por ello, se tuvo que mantener el uso de la amina como disolvente y buscar dentro de esta limitación las mejores condiciones de reacción posibles.

### 3.2. Discusión de resultados

**Tabla 3.3.** Optimización de las condiciones de reacción para la síntesis de **3a**.



Entrada	X	Disolvente	Condiciones/ equivalentes de amina	Conv. (%) <sup>a</sup>	3a/2a <sup>b</sup>	Rdto. 3a (%) <sup>c</sup>
1	Br	<i>sec</i> -BuOH	Reflujo, 6 h/ 3 equiv	30	---	---
2	Br	<i>sec</i> -BuOH	Reflujo, 20 h/ 3 equiv	100	0:1	---
3	Br	Amina	MW, 100 °C, 1 min	100	1:1	---
4	Br	Amina	MW, 100 °C, 2 min	100	1:1	---
5	Br	Amina	Reflujo, 22 h	100	1:0	73
6	Br	Amina	Tubo sellado, 100 °C, 4.5 h	100	1:1.6	30
7	I	Amina	MW, 100 °C, 2 min	50	---	---
8	I	Amina	MW, 120 °C, 5 min	100	---	--- <sup>d</sup>
9	I	Amina	Reflujo, 18 h	100	4:1	39

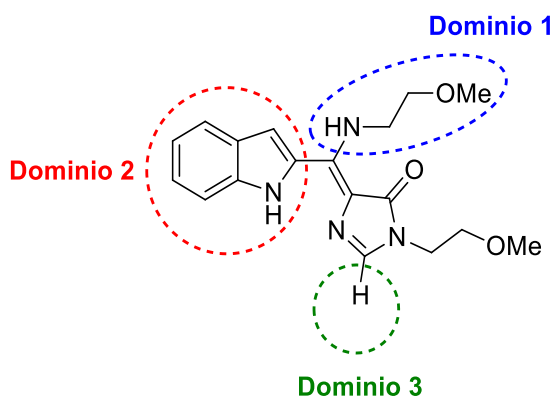
<sup>a</sup>Conversión del producto de partida. <sup>b</sup>Determinado por RMN. <sup>c</sup>Rendimiento del producto aislado. <sup>d</sup>El producto principal de la reacción fue el producto deshalogenado **9a**.

Como se muestra en la **Tabla 3.3**, al llevar a cabo la reacción mediante irradiación por microondas utilizando la amina como disolvente, se produce una reacción rápida pero se obtienen mezclas 1:1 de **3a/2a** en todos los casos (entradas 3 y 4). Las mejores condiciones se consiguieron mediante el uso de la amina como disolvente, calentando a

reflujo y a tiempos largos de reacción. En estas condiciones, se obtuvo el compuesto **3a** como compuesto principal de la reacción y fue aislado con un rendimiento del 73% (entrada 5). Finalmente, se intentó mejorar el rendimiento de la reacción llevándola a cabo en tubo sellado, pero también se obtuvieron mezclas de **3a/2a** (entrada 6). Cuando la reacción se llevó a cabo utilizando como producto de partida el compuesto iodado **11**, se obtuvieron resultados similares, aunque en este caso también se observó la formación del producto deshalogenado, así como la formación preferente del producto **2a**, lo que produce una bajada de los rendimientos de **3a** (entradas 7-9).

### 3.2.2. Síntesis de análogos de **3a**

Una vez optimizada la síntesis del compuesto **3a**, identificado como *hit*, se procedió a la preparación de una serie exploratoria de compuestos en los que se introducirían modificaciones en los dominios mostrados en la **Figura 3.24** para el compuesto **3a**.



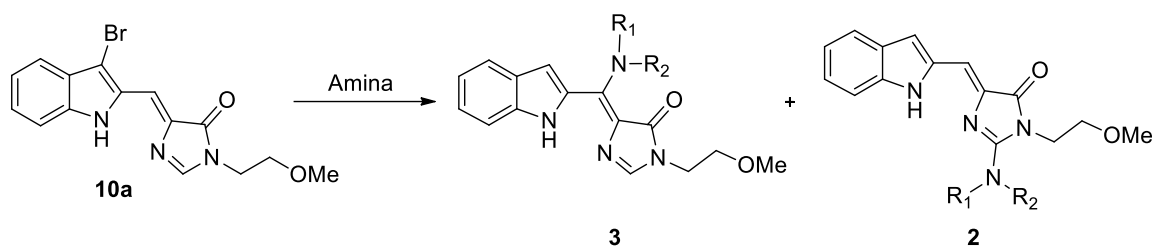
**Figura 3.24.** SAR sobre **3a**.

En primer lugar se decidió explorar el dominio 1 mediante la introducción de distintas aminas en esa posición, lo que además serviría para determinar la generalidad de la reacción aza-Michael sobre la posición metilénica. Posteriormente se introdujeron modificaciones en el dominio 2, comenzando por la introducción de distintos halógenos en el C3 del indol, y finalmente se exploró el dominio 3 con la introducción de sustituyentes en la posición C2 de la imidazolona.

### Modificaciones en el dominio 1

Los resultados obtenidos tras la optimización del último paso de reacción de la ruta desarrollada mostraron la necesidad de utilizar la amina como disolvente y de llevar a cabo la reacción a reflujo. Con el objetivo de evitar la formación de los análogos del cromóforo de la GFP como subproductos de la reacción así como la deshalogenación parcial del producto de partida, se seleccionaron aminas con un punto de ebullición similar al de la 2-metoxietilamina (95 °C). En la **Tabla 3.4** se muestran las aminas seleccionadas, el punto de ebullición de cada una de ellas (que será la temperatura necesaria para llevar a cabo la reacción a reflujo sobre las mismas), así como los productos de reacción obtenidos en cada caso. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando las condiciones optimizadas para **3a**, partiendo del derivado bromado **10a** y se utilizaron aminas primarias y secundarias para explorar la generalidad de la reacción aza-Michael.

**Tabla 3.4.** Síntesis de los compuestos **3j-l**.



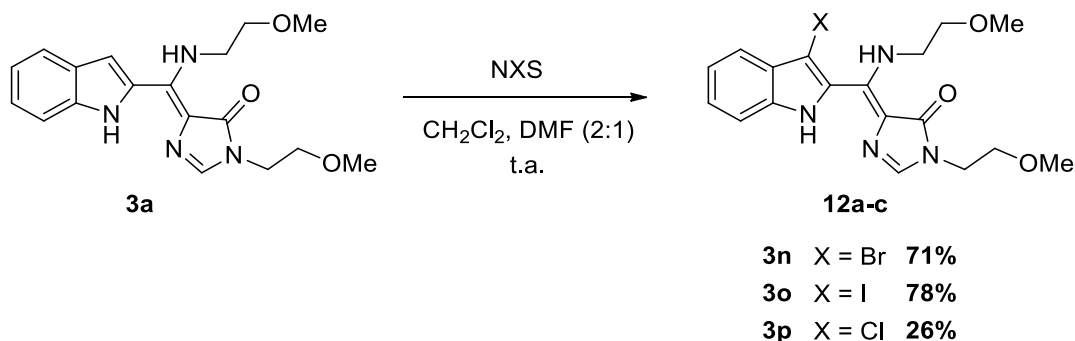
Entrada	Amina	Punto de ebullición (°C)	Rdto. 3 (%)	Rdto. 2 (%)	Compuesto
1	H <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	78	52	---	<b>3j</b>
2	H <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	104-106	13	60	<b>3k/2k</b>
3	H <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	117-118	67	---	<b>3l</b>
4		126-130	---	100	<b>2m</b>



Las reacciones de **10a** con la butilamina y la 3-metoxipropilamina (entradas 1 y 3) se llevaron a cabo sin problemas, obteniéndose como productos principales los compuestos **3j/l**. Sin embargo, en el caso de la *N,N*-dimetiletilendiamina (entrada 2), el producto **3k** se obtuvo con bajo rendimiento debido a la formación de **2k**, derivado del ataque al C2 de la imidazolona, que se aisló con rendimientos de hasta el 60%. Como amina secundaria representativa se utilizó la morfolina, que reaccionó con **10a** dando lugar de forma cuantitativa al compuesto no deseado **2j**. A la vista de este resultado se decidió restringir a aminas primarias la reacción de aminas con **10a**.

### **Modificaciones en el dominio 2**

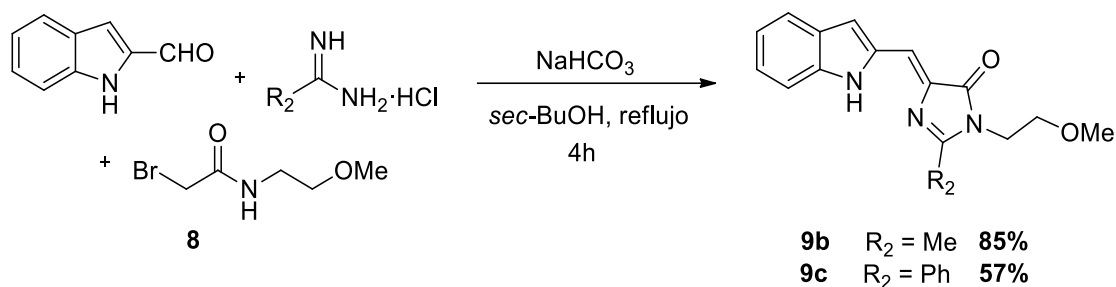
También se exploró la diversidad estructural en el indol, para lo cual se intentó la introducción de distintos halógenos en la posición C3 del mismo aprovechando su carácter altamente electrófilo. Como era previsible, las reacciones de halogenación utilizando diferentes *N*-halosuccinimidas dieron lugar a los correspondientes compuestos halogenados en el caso de los derivados bromado e iodado **3n** y **3o**, que se obtuvieron con buenos rendimientos. Sin embargo, el derivado clorado **3p** se obtuvo con un rendimiento máximo del 26% pese a la utilización de distintas condiciones de reacción (variación del disolvente, nº equivalentes de NCS y tiempos de reacción). En el **Esquema 3.6**, se muestra la síntesis de estos compuestos.



**Esquema 3.6.** Síntesis de los compuestos **3n-p**.

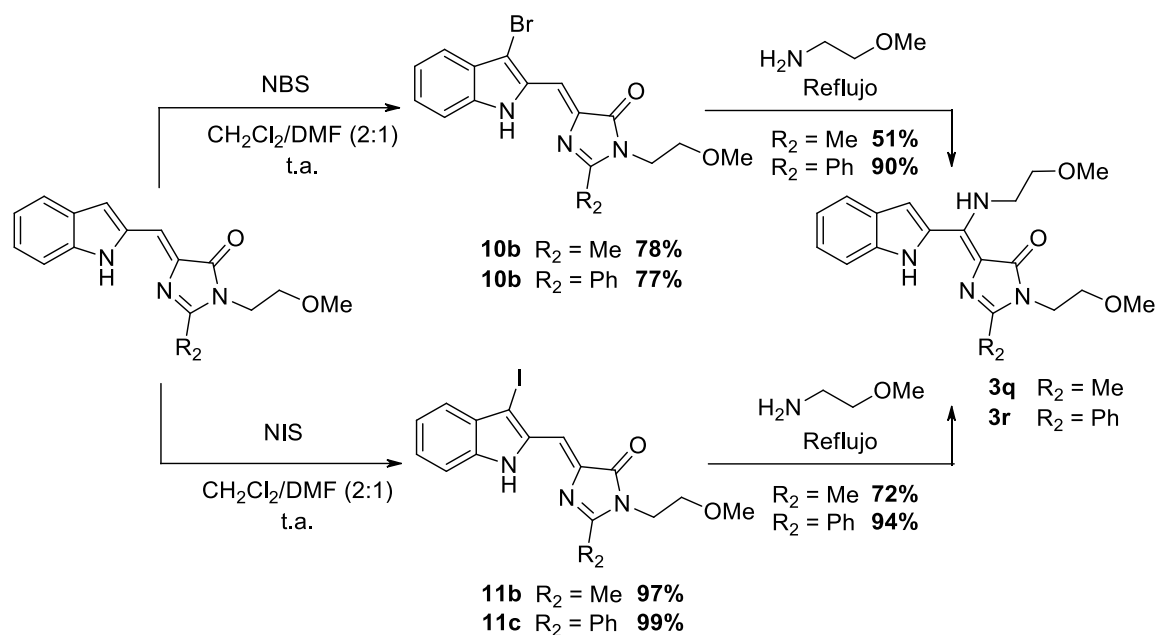
### Modificaciones en el dominio 3

Finalmente, para explorar tanto el alcance de la reacción multicomponente inicial como el de la aza-Michael con salida de halógeno, se introdujeron modificaciones en el dominio 3. Para ello, se llevó a cabo la ruta sintética diseñada utilizando como reactivos de partida los clorhidratos de acetamidina y benzamidina, con los que se planeaba obtener, respectivamente, los compuestos análogos de **3a** con un grupo metilo y fenilo como sustituyente  $R_2$  en la posición C2 de la imidazolona. De esta forma, la reacción multicomponente proporcionó los compuestos **9b** y **9c** con rendimientos del 85% y 57%. El rendimiento medio obtenido en el caso del compuesto **9c** en comparación con el buen rendimiento para **9b** se asocia a la formación, como subproducto importante de la reacción, del isómero *E*. Este isómero también se forma en el caso de los análogos **9a** ( $R_2=H$ ) y **9b** ( $R_2=Me$ ) pero en cantidades de trazas.



**Esquema 3.7.** Síntesis de los compuestos **9b** y **9c**.

Posteriormente se realizó la halogenación de los compuestos **9b** y **9c** por tratamiento con NBS y NIS y, finalmente, los derivados obtenidos **10b/c** y **11b/c** se hicieron reaccionar con 2-metoxietilamina en condiciones de reflujo para proporcionar los análogos **3q** y **3r** (**Esquema 3.8**).



Esquema 3.8. Síntesis de los compuestos 3q y 3r.

En relación a los sustituyentes en posición C2 de la imidazolona, se pueden observar diferencias significativas en los rendimientos de las reacciones multicomponente y la introducción de la amina. La acetamidina dio lugar a mejores rendimientos en la reacción multicomponente que la benzamidina (85% vs 57%), pero la reacción con la amina es más favorable cuando el fenilo es el sustituyente en la imidazolona, tanto para el precursor bromado como iodado. Al no existir competencia entre varias posiciones en el ataque de la amina debido al bloqueo de la posición C2 de la imidazolona, los rendimientos de este último paso son mejores en ambos casos que en el caso de la formamidina. Además, cabe destacar que en ambos casos las reacciones producen mejor rendimiento cuando el halógeno es un iodo –la reacción de halogenación es de un 97–99% en el caso del iodo, frente a un 77–78% para bromo, y el ataque de la amina es de un 51–90% para los derivados bromados frente a un 72–94% para los iodados–, siendo excelentes los rendimientos de los dos últimos pasos de reacción para los derivados con fenilo (99 y 94%).

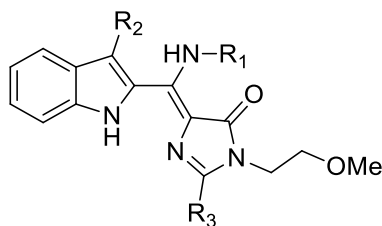
### 3.2.3. Ensayos de inhibición de calpaína

Una vez sintetizados, los compuestos de esta serie fueron enviados al laboratorio de los doctores Diego y Manuel Rodríguez Puyol en la Unidad de Fisiología del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá, donde se realizaron los ensayos de inhibición de calpaína.

En primer lugar, se realizó un ensayo de lisis de un sustrato fluorescente conteniendo dos puentes disulfuro, Suc-Leu-Tyr-AMC (Calpain Substrate II, fluorogenic, Calbiochem, Ref: 208731, Darmstadt, Alemania), de forma que la actividad enzimática es proporcional a la señal fluorescente. El ensayo se realizó de la siguiente manera:

- Obtención de un extracto proteico a partir de células mesangiales humanas en cultivo. Siempre se trabajó con el extracto recién obtenido, en condiciones adecuadas para mantener la actividad enzimática.
- Incubación del extracto proteico durante 60 minutos a 37 °C, con 50 µM de Suc-Leu-Tyr-AMC y 1 µM de los distintos inhibidores de calpaína. En todos los casos se utilizó como control la calpeptina, (1 µM de calpeptin, Calbiochem, Ref: 03-34-0051).
- Medida espectrofluorimétrica de la actividad de calpaína intracelular, excitación: 380 nm; emisión: 460 nm.

El porcentaje de inhibición se expresa en comparación con el de la calpeptina, considerando éste como el 100%. Este ensayo se utilizó para realizar un *screening* rápido de los compuestos sintetizados para detectar una potencial actividad inhibitoria. Para la determinación de los IC<sub>50</sub> se midió la actividad de calpaína utilizando el kit comercial Calpain Activity Assay Kit (BioVision, CA, USA), basado en la detección de la rotura del sustrato de calpaínas Ac-LLY-AFC, y con la calpaína 1 como control positivo. Los resultados de actividad inhibitoria y de IC<sub>50</sub> obtenidos se muestran en la **Tabla 3.5**.

**Tabla 3.5.** Inhibición e IC<sub>50</sub> de los compuestos **3j-l** y **3n-r**.

Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Inhibición (%) <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>
<b>3j</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	75.4	0.35
<b>3k</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NMe <sub>2</sub>	H	H	64.6	>1
<b>3l</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OMe	H	H	71.8	1.02
<b>3n</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OMe	Br	H	62.9	>1
<b>3o</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OMe	I	H	76.8	1.08
<b>3p</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OMe	Cl	H	71.9	>1
<b>3q</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OMe	H	Me	93	0.02
<b>3r</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OMe	H	Ph	21.5	>1

<sup>a</sup>% Inhibición utilizando un extracto proteico. Referencia: calpeptina, 100% inhibición.

<sup>b</sup>IC<sub>50</sub> determinado utilizando un kit comercial.

El papel del grupo alquilamino R<sub>1</sub> se examinó con los compuestos **3j-l**. La sustitución del heteroátomo por un grupo metileno da lugar a un compuesto con una actividad similar (**3j**), mientras que la introducción de un metileno adicional en la cadena alquílica respecto a **3a** (**3l**) produce una ligera disminución en la actividad. El mayor cambio en la actividad se produce al sustituir el grupo metoxi por un grupo dimetilamino (**3k**), observándose una disminución significativa en la inhibición. Por otro lado, la introducción de halógenos en la posición C3 del indol dio lugar a

compuestos menos activos (**3n-p**) independientemente del halógeno presente, mostrando mejor actividad el compuesto con un iodo en esta posición (**3o**). Sin embargo, la introducción de sustituyentes en la posición C2 de la imidazolona parece ser determinante para la inhibición. Mientras que la introducción de un fenilo en esa posición da lugar a un compuesto prácticamente inactivo (inhibición de un 21.5% en el extracto proteico), al introducir un metilo se consigue un aumento significativo de la inhibición (**3r**,  $IC_{50} = 20$  nM), obteniéndose un compuesto 5 veces más potente que el *hit* **3a**.

De este modo, la síntesis de esta serie exploratoria inicial de compuestos con cierta diversidad estructural en tres dominios de **3a** nos ha permitido determinar que la amina utilizada y el sustituyente en la posición C2 de la imidazolona parecen modular de forma significativa la actividad inhibitoria de calpaina de los compuestos preparados hasta el momento, e identificar un análogo (compuesto **3r**) con actividad mejorada en comparación con **3a**.

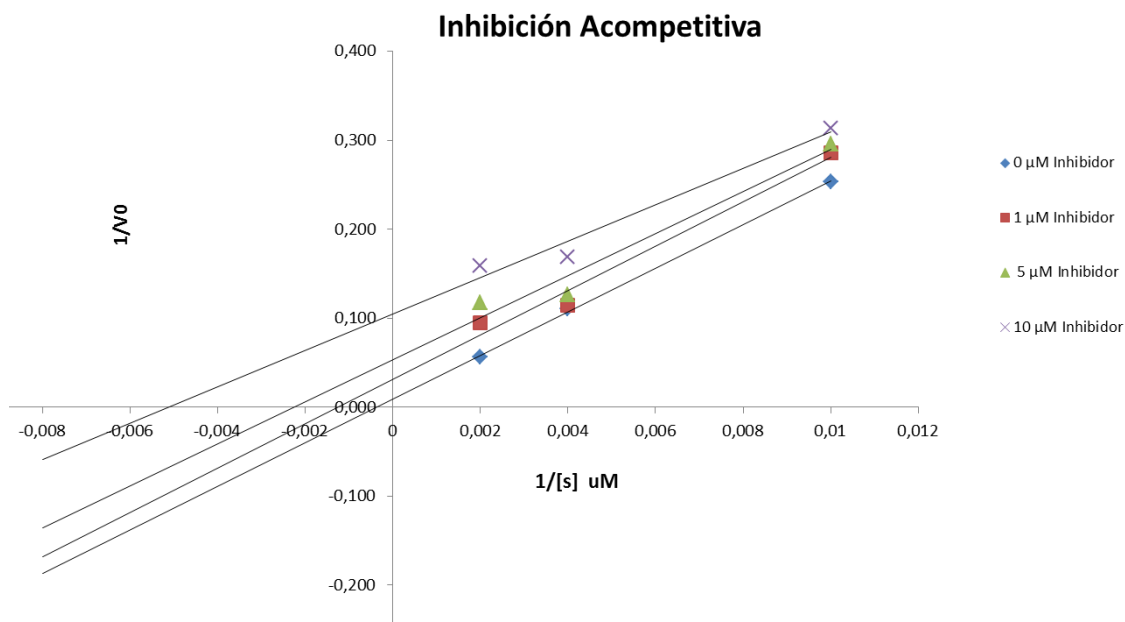
#### *Mecanismo de inhibición*

En el grupo de los Dres. Rodríguez Puyol, la Dra. Laura Calleros también llevó a cabo el estudio del mecanismo de inhibición, tomando como modelo el compuesto cabeza de serie **3a**. En la **Figura 3.26** se muestra el diagrama de Lineweaver-Burk<sup>172,173</sup> obtenido para concentraciones de inhibidor de 1, 5 y 10  $\mu$ M, así como en ausencia del inhibidor.

---

<sup>172</sup> **Diagrama de Lineweaver-Burk:** representación gráfica de la ecuación de Lineweaver-Burk de cinética enzimática.

<sup>173</sup> Lineweaver, H; Burk, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, 56, 658 – 666.



**Figura 3.26.** Diagrama de Lineweaver-Burk para el compuesto **3a**. Eje de abscisas: inversa de la concentración de sustrato. Eje de ordenadas: inversa de la velocidad de la reacción.

El diagrama obtenido muestra que las rectas con distintas concentraciones de inhibidor y en ausencia del mismo tienen una pendiente muy similar y cortan el eje de ordenadas en puntos distintos, lo cual probaría que la inhibición de este compuesto es consistente con un modo de inhibición incompetitivo.

#### *Ensayos de actividad antiapoptótica*

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso fisiológico natural destinado a la eliminación de células defectuosas en distintos tejidos. Sin embargo, la regulación al alza de la misma bajo condiciones patológicas resulta en un daño en los tejidos y la pérdida de la funcionalidad de los mismos.<sup>174</sup> Como se ha mencionado en el apartado de *Antecedentes*, muchos procesos apoptóticos presentan un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, por lo que la actividad de las calpaínas parece ejercer cierta influencia sobre los mismos. De hecho, según indican varios

<sup>174</sup> Linton, S. D. *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, 5, 1697 – 1717.

estudios,<sup>67,75,119</sup> el uso de inhibidores de calpaínas parece reducir la extensión de las lesiones en ciertos tejidos afectados por apoptosis, así como mejorar la recuperación de las funciones de los mismos.

Por otro lado, la azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) ha sido ampliamente utilizada como herramienta en estudios de citotoxicidad y constituye un protocolo utilizado para inducir una *isquemia química* en cultivos celulares,<sup>175</sup> ya que mimetiza el agotamiento de la energía celular que tiene lugar, por ejemplo, en la isquemia cerebral. Además, puede inducir un aumento reversible en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, y por lo tanto aumenta la apoptosis mediada por calpaína.<sup>176,177</sup>

Para comprobar los efectos biológicos de los inhibidores de calpaínas sintetizados, la Dra. Laura Calleros también llevó a cabo esta *isquemia química in vitro* en una línea celular de epitelio tubular renal (HK-2). En primer lugar, se realizó un estudio de dosis y tiempo de respuesta para seleccionar las condiciones en las cuales la azida sódica provoca un aumento de la actividad de calpaína y la apoptosis en el modelo celular. En la **Figura 3.27** se muestran los resultados obtenidos. Arriba (A) se observa que la incubación con  $\text{NaN}_3$  200 mM durante 30 minutos, seguida de una recuperación durante toda la noche, aumenta la actividad de calpaína intracelular en un 100%. Para analizar el efecto biológico de la activación de calpaína, se evaluó la inducción de apoptosis en la línea celular HK-2, analizando la población celular sub-G1 hipodiploide mediante citometría de flujo (B). Como se esperaba, los cultivos expuestos a  $\text{NaN}_3$  durante 30 minutos, mostraron un aumento del 25.3% en los niveles de apoptosis tras 24h de recuperación.

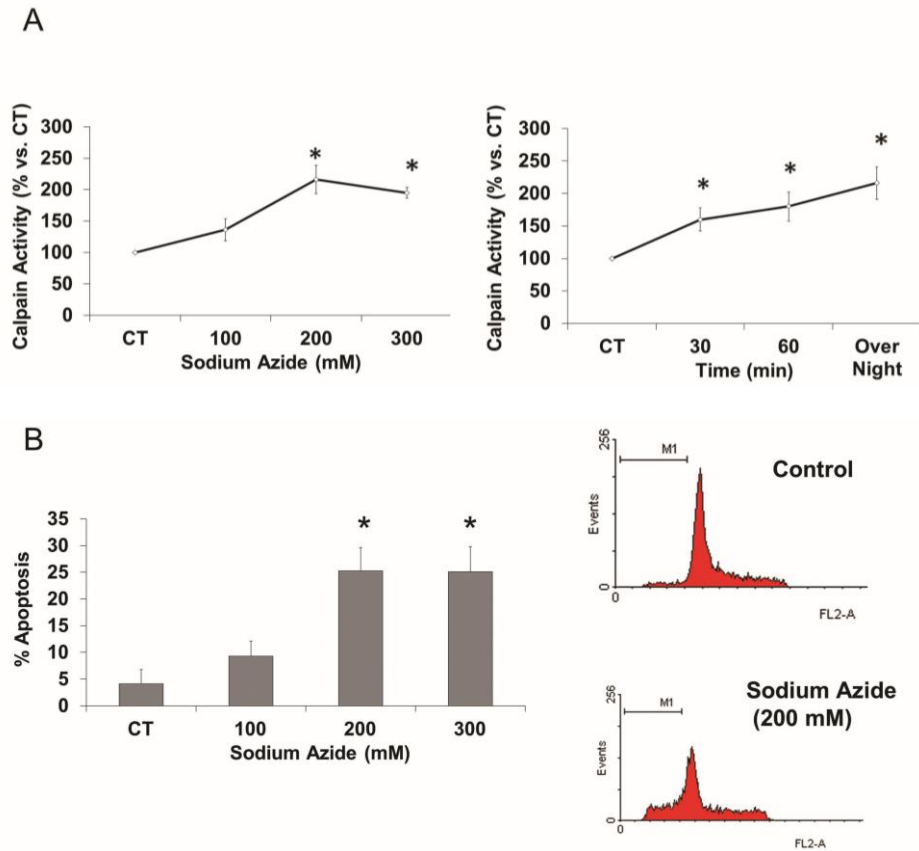
---

<sup>175</sup> (a) Marino, S.; Marani, L.; Nazzaro, C.; Beani, L.; Siniscalchi, A. *Neurotoxicology* **2007**, 28, 622 – 629. (b) Brooks C.; Wei, Q.; Cho, S. G.; Dong, Z. *J. Clin. Invest.* **2009**, 119, 1275 – 1285.

<sup>176</sup> Chen, S. J.; Bradley, M. E.; Lee, T. C. *Mol. Cell. Biochem.* **1998**, 178, 141 – 149.

<sup>177</sup> Olmos, G.; Arenas, M.; Bienes, R.; Calzada, M. J.; Aragonés, J.; García-Bermejo, M. L.; Landazuri, M. O.; Lucio-Cazaña, J. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, 66, 2167 – 2180.



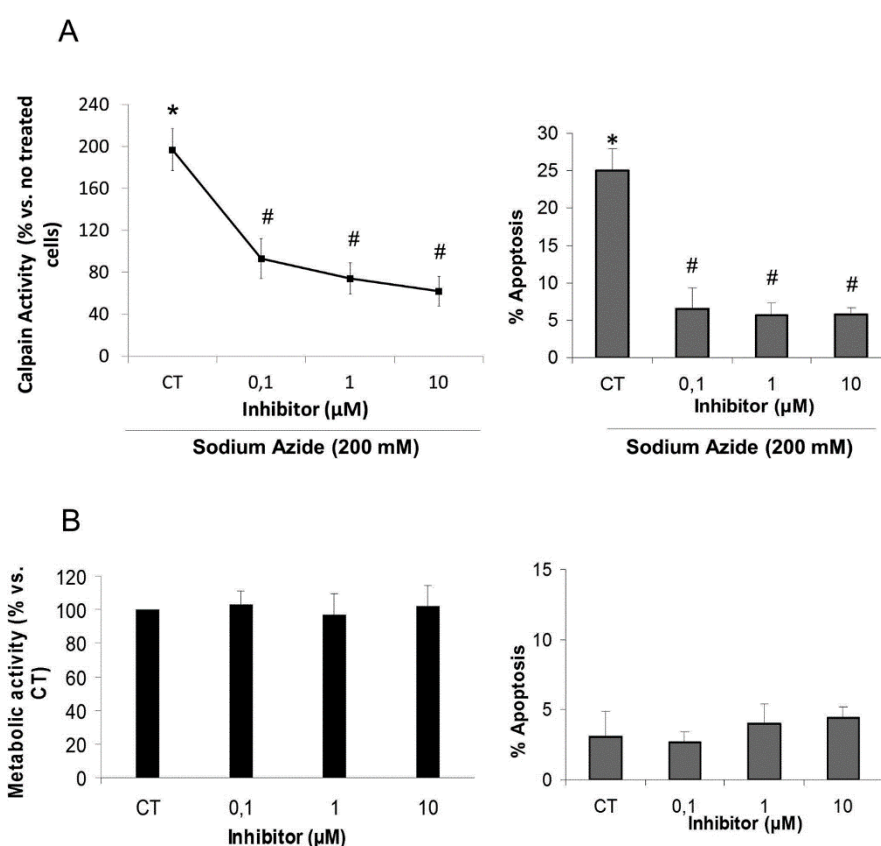


**Figura 3.27.** Actividad de calpaína y apoptosis inducida por azida sódica en células HK-2. (A) Las células HK-2 se incubaron en medio de cultivo (control) con o sin distintas concentraciones de  $\text{NaN}_3$  durante 30 minutos, seguido de una recuperación durante toda la noche (izquierda) o con  $\text{NaN}_3$  200 mM durante 30 minutos, seguido de distintos tiempos de recuperación (derecha). El ensayo de actividad de calpaínas se llevó a cabo con un espectrofluorímetro de microplaca. (B) Las células HK-2 fueron incubadas en medio de cultivo (control) con o sin distintas concentraciones de azida sódica durante 30 minutos, seguido de una recuperación de 24 horas, tras la cual se determinó la apoptosis en células teñidas con ioduro de propidio, mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control, y representan la media  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). \*Diferencias significativas respecto al medio de cultivo control (CT)  $p < 0.05$ .

A continuación, se realizó un estudio de la capacidad de estos inhibidores para revertir estos procesos celulares. Se evaluó el efecto de la co-incubación de células HK-

2 con el inhibidor **3a** en un rango de dosis de 0.1–10  $\mu\text{M}$ . Los resultados obtenidos indicaron que el aumento de la actividad de calpaína inducida por azida sódica era completamente revertido mediante la co-incubación con el inhibidor **3a** a todas las dosis testadas (**Figura 3.28A**). Además, el inhibidor era capaz de anular completamente la apoptosis producida en células intactas expuestas a  $\text{NaN}_3$ .

Finalmente, se ensayó la potencial toxicidad celular del inhibidor **3a**. Como se muestra en la **Figura 3.28B**, a cualquiera de las dosis testadas (0.1–10  $\mu\text{M}$ ) el inhibidor no muestra toxicidad celular, medida como actividad metabólica mediante el ensayo MTT. Además, estas dosis eran incapaces de inducir apoptosis en la línea celular HK-2.



**Figura 3.28.** Bloqueo del aumento de la actividad de calpaínas y la apoptosis inducida por azida sódica por el inhibidor **3a**, sin inducir toxicidad celular, en células HK-2. (A) Las células HK-2 fueron incubadas en medio de cultivo (control) con  $\text{NaN}_3$  200mM, durante 30

minutos, seguido de una recuperación durante toda la noche para la determinación de la actividad de calpaína (izquierda) y durante 24 horas para la inducción de apoptosis (derecha), con o sin distintas concentraciones (0.1–10  $\mu\text{M}$ ) del inhibidor **3a**. Después de la incubación, se realizó el ensayo de medida de la actividad de calpaína mediante un espectrofluorímetro de microplaca. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al medio de cultivo control (células no tratadas). La apoptosis se determinó en células teñidas con ioduro de propidio, mediante citometría de flujo. (B) Las células HK-2 fueron cultivadas en medio de cultivo (control) con o sin distintas concentraciones (0.1–10  $\mu\text{M}$ ) del inhibidor **3a**, y después se midió la viabilidad celular por ensayo de MTT o se determinó la apoptosis en células teñidas con ioduro de propidio mediante citometría de flujo. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM (n=5). \*Diferencias significativas respecto al medio de cultivo control  $p < 0.05$ , #Diferencias significativas respecto a las células tratadas solo con azida sódica  $p < 0.05$ .

En conjunto, los datos indican que el inhibidor **3a** es capaz de bloquear una inducción de apoptosis por *isquemia química*, mediante la prevención del aumento de la actividad de calpaína dependiente de azida sódica en células de epitelio tubular renal humanas intactas.

### ***Modelado molecular***

En el momento de redactar esta Memoria se está llevando a cabo un estudio de modelado molecular en el grupo de la Prof.<sup>a</sup> Dra. Beatriz de Pascual-Teresa en el Departamento de Química de la Universidad CEU San Pablo. A continuación se muestran los resultados de los que disponemos por el momento.

El modo de unión de los ligandos más activos fue explorado inicialmente mediante simulaciones de *docking*. La proteína diana utilizada para realizar el *docking* fue seleccionada entre las estructuras cristalinas de calpaína 1 disponibles, depositadas en el Protein Data Bank (PDB). Se seleccionó la estructura cristalina 4WQ2 por su alta resolución (1.64 Å) y porque ha sido cristalizada junto con un inhibidor alostérico de una familia estructural similar a esta serie de compuestos.<sup>178</sup>

Como ya se ha mencionado, el dominio PEF(S) de la subunidad reguladora es un dominio tipo calmodulina de unión al  $\text{Ca}^{2+}$ . 4WQ2 contiene la región *penta-EF-hand*

---

<sup>178</sup> Adams, S. E.; Rizkallah, P. J.; Miller, D. J.; Robinson, E. J.; Hallett, M. B.; Allemann, R. K. *J. Struct. Biol.* **2014**, 187, 236 – 241.

PEF(S) de la calpaína 1 humana en complejo con un inhibidor alostérico rígido. Este inhibidor se une a dos hélices  $\alpha$  que forman un bolsillo hidrofóbico, que constituye el sitio de unión de un residuo de leucina de la calpastatina, el inhibidor endógeno de las calpaínas.

La proteína diana se preparó extrayendo el inhibidor de la estructura cristalina y siguiendo el protocolo de *docking* que se detalla a continuación:

**Protocolo de *docking*:** Se obtuvo la estructura cristalina del dominio PEF(S) de la calpaína del PDB con el código 4WQ2. Utilizando el asistente de preparación de proteínas de Schrödinger Suite,<sup>179</sup> se añadieron las cadenas laterales y los residuos que faltaban en la estructura cristalina. Los estados de protonación de los aminoácidos cargados se calcularon con el módulo PROPKA de Schrödinger Suite, el cual predijo que el residuo His131 se encontraría protonado a pH=7. Los ligandos se construyeron con el módulo LigPrep de Maestro (Schrödinger Release 2017-1: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017), que generó todos los estados de protonación posibles a pH=7. Como se esperaba, ninguno de los ligandos se encuentra protonado a este pH. Posteriormente, se calculó una malla cúbica (*grid box*) en el receptor con un tamaño de 22 Å, con un centroide entre los aminoácidos que forman el bolsillo de unión (*binding pocket*). Los cálculos iniciales de *docking* se llevaron a cabo utilizando el modo de extra precisión (XP) del módulo Glide.<sup>180,181,182</sup>

Las simulaciones de *docking* se llevaron a cabo para los compuestos **3a**, **3b**, **3j-l**, y **3n-r**. Según estos estudios preliminares, todos los ligandos ocuparon el sitio de unión descrito previamente para inhibidores alostéricos, si bien las orientaciones diferían entre sí. Por esta razón, se decidió refinar aún más las orientaciones de *docking* inicialmente para los seis compuestos activos (**3a**, **3b**, **3j**, **3l**, **3o** y **3q**). Estos seis compuestos fueron

<sup>179</sup> Madhavi Sastry, G.; Adzhigirey, M.; Day, T.; Annabhimoju, R.; Sherman, W. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2013**, *27*, 221 – 234.

<sup>180</sup> Friesner, R. A.; Murphy, R. B.; Repasky, M. P.; Frye, L. L.; Greenwood, J. R.; Halgren, T. A.; Sanschagrin, P. C.; Mainz, D. T. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6177 – 6196.

<sup>181</sup> Halgren, T. A.; Murphy, R. B.; Friesner, R. A.; Beard, H. S.; Frye, L. L.; Pollard, W. T.; Banks, J. L. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1750 – 1759.

<sup>182</sup> Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739 – 1749.

sometidos a un protocolo de *Induced Fit Docking* con la finalidad de tener en cuenta la flexibilidad de las cadenas laterales alrededor del sitio de unión. Los *Induced Fit Docking* se realizaron utilizando el *Extended Sampling Protocol* del módulo Glide,<sup>183</sup> utilizando los mismos aminoácidos para el centroide de la malla cúbica. Este procedimiento generó hasta 80 poses por cada ligando.

En la **Figura 3.29** se representan los modos de unión predichos para los compuestos **3a**, **3b**, **3q**, **3j**, **3l** y **3o**. En las poses de menor energía, los seis compuestos ocupan el sitio de unión alostérico. En general, la región del indol establece con el residuo Trp168 una interacción  $\pi$ - $\pi$  *stacking* (**3j**, **3l**, **3o** y **3q**) o en forma de T (**3a** y **3b**), complementadas con un entorno hidrofóbico delimitado por las cadenas laterales de los residuos Leu120, Ile123, Val124, Met147, Leu167 and Ile171. El residuo His131 forma un enlace de hidrógeno adicional con el oxígeno de la cadena lateral de metoxietilo en la región de la imidazolona de **3q** y el residuo Gln175 forma un enlace de hidrógeno con la cetona de la imidazolona. Sin embargo, en **3j**, la cetona forma un enlace de hidrógeno con el residuo His131. El compuesto **3l** forma un enlace de hidrógeno con el residuo His131 a través del grupo metoxipropilo unido al grupo amino del carbono exocíclico, y **3a** a través de su grupo metoxietilo análogo. La cetona de la región de la imidazolona de **3a** establece un enlace de hidrógeno con la cadena lateral del residuo Lys172 mientras que el sustituyente metoxietilo de la imidazolona establece un enlace de hidrógeno con la cadena lateral de Trp168. En contraste, el compuesto **3b** establece un puente de hidrógeno mediante uno de los nitrógenos de la imidazolona con la cadena lateral de Trp168, y mediante el grupo metoxietilo de la imidazolona con la cadena lateral de Lys172.

---

<sup>183</sup> Sherman, W.; Day, T.; Jacobson, M. P.; Friesner, R. A.; Farid, R. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 534 – 553.

### 3.2. Discusión de resultados

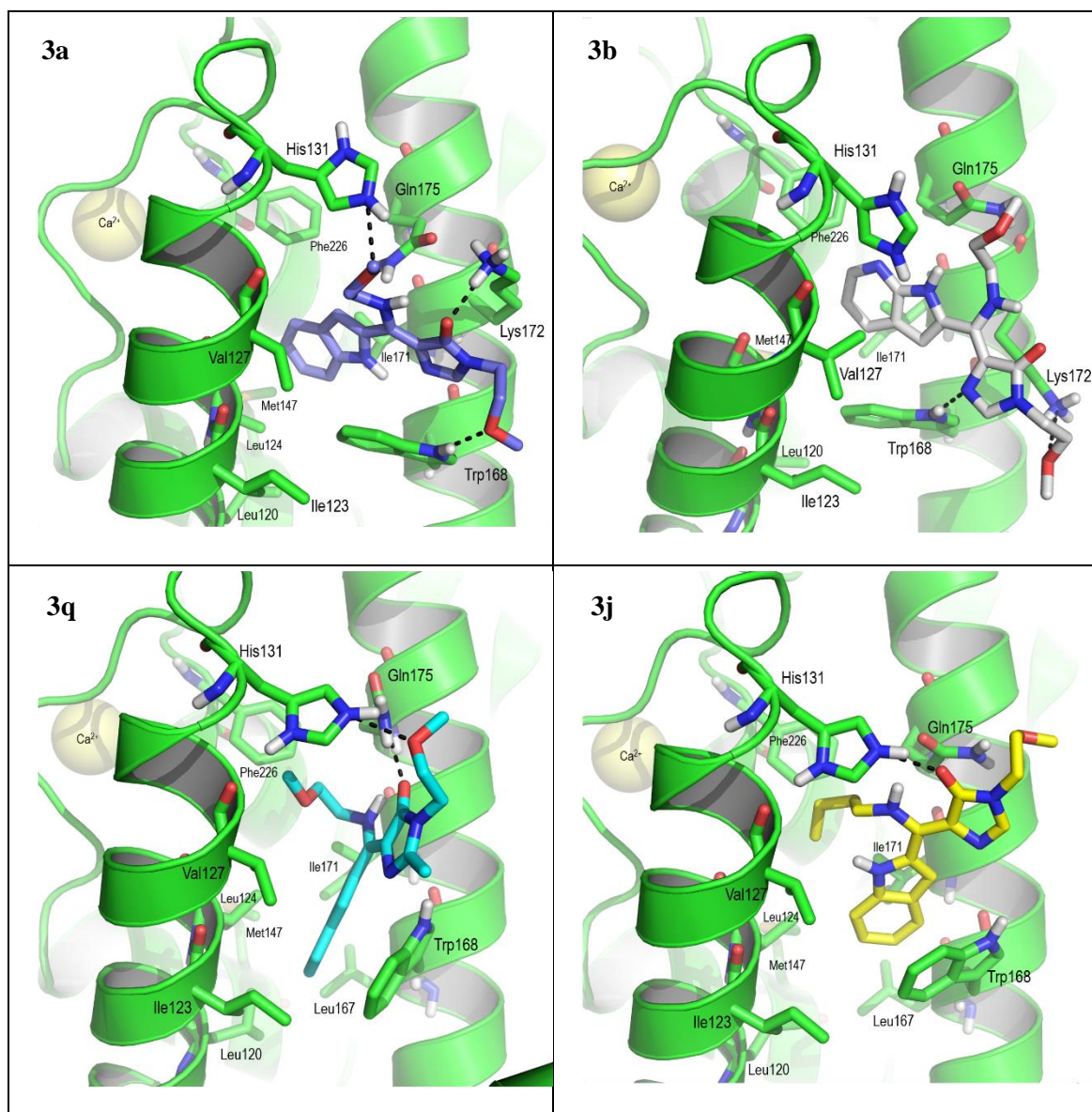
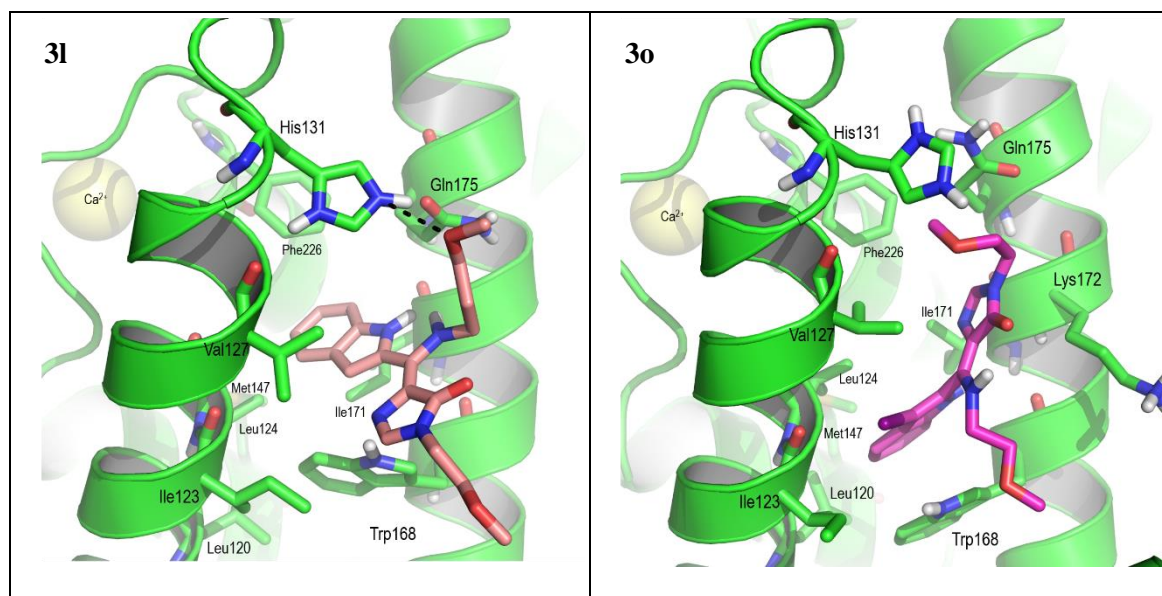


Figura 3.29.



**Figura 3.29 (Continuación).** Modos de unión predichos para **3a**, **3b**, **3q**, **3j**, **3l** y **3o**, respectivamente. Las proteínas se muestran como representaciones de la estructura secundaria en color verde, con los residuos que interaccionan con el ligando mostrados como *sticks*. Los ligandos se muestran en *sticks*, con los átomos de carbono en color morado, blanco, cían, amarillo, rosa claro y magenta, respectivamente, y los átomos de nitrógeno en color rojo, los de oxígeno en color azul y los de hidrógeno blanco en todos los casos. Para una mayor claridad, solo se muestran los hidrógenos polares.

Con la finalidad de evaluar la estabilidad de los modos de unión propuestos para **3a**, **3b**, **3j**, **3l**, **3o** y **3q**, y para realizar un análisis en profundidad de las interacciones relevantes, actualmente se están llevando a cabo simulaciones de dinámica molecular (MD) para todos los complejos predichos, seguidas de un análisis utilizando el módulo MM-ISMSA.<sup>184</sup>

<sup>184</sup> Klett, J.; Nunez-Salgado, A.; Dos Santos, H. G.; Cortes-Cabrera, A.; Perona, A.; Gil-Redondo, R.; Abia, D.; Gago, F.; Morreale, A. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, 8, 3395 – 3408.

Como conclusiones de este capítulo, se ha conseguido desarrollar una metodología sintética apropiada para preparar una serie de 8 compuestos análogos a **3a** (*hit*,  $IC_{50} = 0.46 \mu M$ ) logrando obtener los compuestos objetivo en cuatro pasos de reacción y con rendimientos aceptables en cada uno de los pasos. Algunos de estos compuestos no serían accesibles a través del procedimiento sintético anteriormente empleado. Se ha logrado introducir cierta diversidad molecular en la posición C3 del indol, en la posición C2 de la imidazolona y en la sustitución del carbono metilénico. Los resultados iniciales del SAR sobre la inhibición de calpaina de esta serie reducida de compuestos parecen indicar que la sustitución en la posición C2 de la imidazolona juega un papel relevante en la modulación de la actividad inhibitoria, que también se vería afectada –aunque en menor medida– por el tipo de amina incorporada en la posición metilénica. Por su parte, el tipo de halógeno empleado como sustituyente en la posición C3 del indol apenas modifica el porcentaje de inhibición.

Los resultados obtenidos en los ensayos para elucidar el tipo de mecanismo de inhibición, realizados sobre el compuesto **3a**, avalan una inhibición acompetitiva para este inhibidor, que concuerda con la inhibición alostérica esperada. Los estudios de *docking* iniciales nos han permitido proponer modos de unión de los inhibidores activos con el centro alostérico de la calpaína 1 y estudiar las posibles interacciones que se establecen. Además, el compuesto **3a** ha sido utilizado en ensayos de apoptosis mediante una *isquemia química* inducida *in vitro* por azida sódica sobre células epiteliales humanas del túbulo renal HK-2. Los resultados han mostrado que **3a** es capaz de bloquear esta apoptosis a través de la inhibición de calpaína sin inducir toxicidad celular.



## 4. Heterociclaciones con TosMIC. Síntesis de isoquinolinas 1,3-disustituidas, $\gamma$ -carbolinas y Cassiarina A

### 4.1. Antecedentes generales

### 4.2. Parte I. Heterociclación de derivados de $\alpha$ -arilmetil TosMIC con electrófilos: Síntesis de isoquinolinas

### 4.3. Parte II. Heterociclación de derivados de $\alpha$ -metilindolil TosMIC con ácidos y electrófilos: Síntesis de $\gamma$ -carbolinas

### 4.4. Parte III. Síntesis total de Cassiarina A



## 4.1. ANTECEDENTES GENERALES

### 4.1.1. ISONITRILOS

Los isonitrilos son una familia de compuestos orgánicos en cuya estructura se encuentra presente el grupo funcional isociano, R-NC. La primera síntesis de un isonitrilo fue llevada a cabo por Lieke en 1859,<sup>185</sup> pero debido a su olor desagradable y la dificultad en su preparación,<sup>185,186</sup> el interés por ellos no resurgió hasta hace unas décadas.

#### 4.1.1.1. Características electrónicas

Las características electrónicas y estructurales de este tipo de compuestos han sido ampliamente estudiadas. Nef sugirió la representación de los mismos como carbenos,<sup>187</sup> de forma que el carbono y el nitrógeno se encuentran conectados por un doble enlace. Mientras, Lindemann y Wiegrebé<sup>188</sup> propusieron una estructura dipolar (*zwitteriónica*) en analogía al monóxido de carbono, en la que los átomos de carbono y nitrógeno están unidos mediante un triple enlace, con una carga formal positiva en el átomo de nitrógeno y una carga formal negativa en el átomo de carbono. La primera representación permite explicar el carácter ambivalente del átomo de carbono terminal, mientras que la segunda concuerda con el carácter de triple enlace encontrado para el enlace NC mediante técnicas de determinación del momento dipolar, IR y difracción de electrones.<sup>189</sup> Por ello, se suele aceptar la representación de los mismos mediante dos estructuras resonantes.



**Figura 4.1.** Estructuras resonantes de los isonitrilos.

<sup>185</sup> Lieke, W. *Ann. Chem. Pharm.* **1859**, 112, 316 – 321.

<sup>186</sup> Hofmann, A. W. *Ann. Chem. Pharm.* **1867**, 144, 114 – 120.

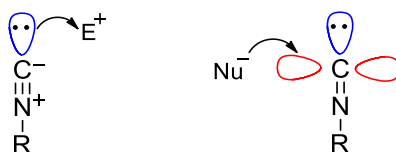
<sup>187</sup> (a) Nef, J. U. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1892**, 270, 267 – 335. (b) Nef, J. U. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1899**, 309, 126.

<sup>188</sup> Lindemann, H.; and Wiegrebé, L. *Chem. Ber.* **1930**, 63, 1650 – 1657.

<sup>189</sup> (a) Dadiou, A. *Chem. Ber.* **1931**, 64B, 358 – 361. (b) Gordy, W.; Pauling, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, 64, 2952 – 2953. (c) Brockway, L. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, 58, 2516 – 2518. (d) Bak, B.; Hansen-Nygaard, L.; Rastrup-Andersen, J. *J. Mol. Spectrosc.* **1958**, 2, 54 – 57.

## 4.1.1.2. Reactividad

La propiedad más interesante de los isonitrilos desde un punto de vista sintético es su capacidad para reaccionar con nucleófilos y electrófilos en el mismo carbono, propiedad que comparten con los carbenos y el monóxido de carbono. Su reactividad como nucleófilo se debe a la interacción del orbital  $p_\pi$  del carbono terminal con los pares de electrónicos no enlazantes del nitrógeno. Su reactividad como electrófilo viene dada por el orbital  $p_{\pi^*}$  del carbono terminal, que puede aceptar densidad electrónica de un nucleófilo.<sup>190</sup> Este tipo de reactividad, sin embargo, sólo se observa cuando se emplean nucleófilos fuertes, tales como reactivos organometálicos de litio, magnesio o zinc<sup>191</sup> y en muchos casos es necesaria la utilización de un ácido de Lewis para aumentar la electrofilia de los isonitrilos.<sup>190</sup> Por otro lado, el carbono terminal de los isonitrilos es formalmente divalente, lo que también permite la reacción con radicales.



**Figura 4.2.** Reactividad de los isonitrilos. Izquierda, como nucleófilo; derecha, como electrófilo.

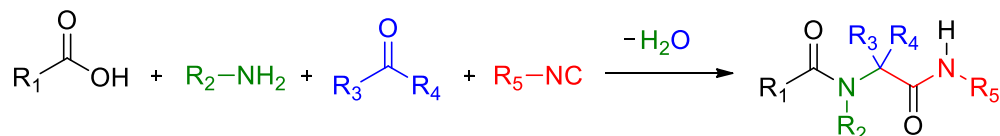
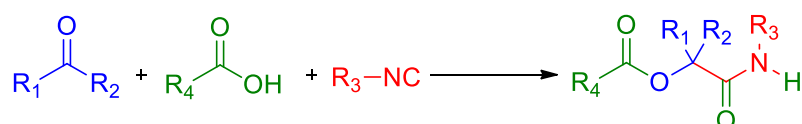
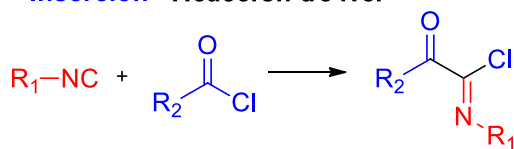
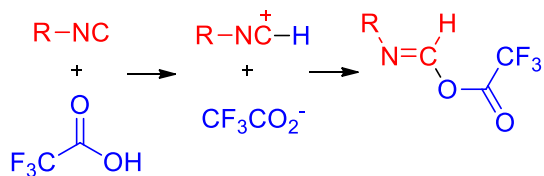
Esta dualidad de los isonitrilos les confiere una gran versatilidad en síntesis orgánica, permitiendo una amplia variedad de transformaciones. Ejemplos de ello son las reacciones de adición, inserción (p.e. reacción de Nef<sup>187</sup>) y protonación<sup>192</sup> que se pueden llevar a cabo sobre su carbono terminal, y han posibilitado el empleo de isonitrilos en reacciones multicomponente (*IMCR*), siendo las reacciones de Ugi<sup>193</sup> (U-4CR) y de Passerini<sup>194</sup> (P-3CR) las más frecuentemente utilizadas.

<sup>190</sup> Tobisu, M.; Chatani, N. *Chem. Lett.* **2011**, 40, 330 – 340.

<sup>191</sup> (a) Niznik, G. E.; W. H. Morrison, W. H. III; Walborsky, H. M. *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 600 – 604. (b) Murakami, M.; Ito, H.; Ito, Y. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 4158 – 4159. (c) Zhao, J.; Peng, C.; Liu, L.; Wang, Y.; Zhu, Q. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 7502 – 7504.

<sup>192</sup> Ramozzi, R.; Chéron, N.; Braïda, B.; Hiberty, P. C.; Fleurat-Lessard, P. *New J. Chem.* **2012**, 36, 1137 – 1140.

<sup>193</sup> (a) Ugi, I.; Meyr, R. *Angew. Chem.* **1958**, 70, 702 – 703. (b) Ugi, I.; Steinbrückner, C. *Angew. Chem.* **1960**, 72, 267 – 268. (c) Ugi, I. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1962**, 1, 8 – 21.

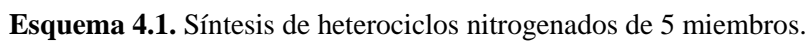
**Adición****- Reacción de Ugi (U-4CR)****- Reacción de Passerini (P-3CR)****Insertión - Reacción de Nef****Protonación**

**Figura 4.3.** Ejemplos de reacciones de adición (IMCR de Ugi y Passerini), inserción y protonación.

Los isonitrilos con un grupo electroatractor en el carbono contiguo al grupo isociano presentan especial interés, ya que la acidez de los hidrógenos en posición  $\alpha$  es mayor en estos compuestos, permitiendo la reacción con diferentes bases para formar un carbanión que puede reaccionar con electrófilos generando isonitrilos  $\alpha$ -sustituidos o adicionarse a doble enlaces activados para formar heterociclos nitrogenados de cinco miembros. En el siguiente esquema se representan las principales transformaciones de este tipo de compuestos en la síntesis de 1,3-azoles, azolinas, pirroles, pirrolinas, 1,2,4-triazoles, 2-imidazolidinonas y tiazinas.<sup>1,195</sup>

<sup>194</sup> Passerini, M.; Ragni, G. *Gazz. Chim. Ital.* **1931**, 61, 964 – 969.

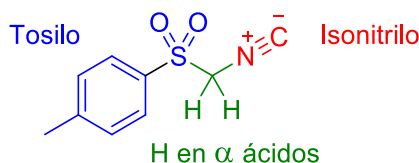
<sup>195</sup> Sadjadi, S.; Heravi, M. M.; Nazari, N. *RSC Adv.* **2016**, 6, 53203 – 53272.



#### 4.1.2. Tosilmetilisonitrilo (TosMIC)

Dentro de este último grupo de isonitrilos, cabe destacar el tosilmetilisonitrilo, comúnmente conocido como TosMIC, descubierto en la década de los 70 por van Leusen *et al.*<sup>196</sup> El TosMIC es un reactivo (*building block*) funcionalizado muy versátil al hacer posible toda una variedad de reacciones con múltiples aplicaciones en síntesis orgánica:

- La elevada acidez de los hidrógenos en posición  $\alpha$  respecto a los grupos isonitrilo y sulfonilo permite la transformación del grupo metileno en un carbanión estabilizado capaz de reaccionar con distintos electrófilos.
- El comportamiento ambivalente del átomo de carbono terminal en el grupo isonitrilo permite la reacción con nucleófilos y electrófilos en el mismo carbono.
- El grupo sulfonilo en posición  $\alpha$  tiene dos funciones: es un buen grupo saliente en distintas condiciones y aumenta la acidez de los hidrógenos en  $\alpha$  al grupo isonitrilo.

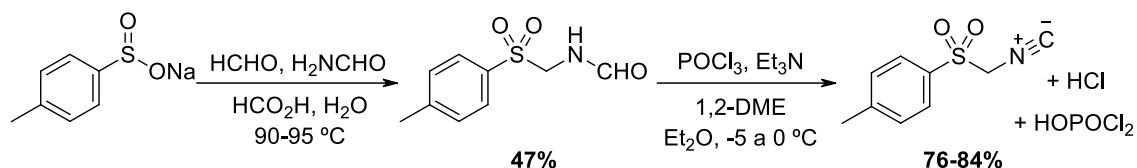


**Figura 4.4.** Estructura de tosilmetilisonitrilo (TosMIC).

La síntesis de TosMIC se realiza en dos pasos: una reacción de Mannich entre el ácido *p*-toluensulfínico, formaldehído y formamida para generar la *N*-(*p*-tolilsulfonilmetil)formamida y su posterior deshidratación empleando tricloruro de fósforo y trietilamina o diisopropilamina (**Esquema 4.2**).

<sup>196</sup> van Leusen, A. M.; Boerma, G. J. M.; Helmholtz, R. B.; Siderius, H.; Strating, J. *Tetrahedron Lett.* **1972**, 23, 2367 – 2368.

#### 4.1. Antecedentes generales



### Esquema 4.2. Síntesis de TosMIC.

Debido a las interesantes propiedades del TosMIC desde un punto de vista sintético, entre las que se pueden destacar su fácil preparación, la tolerancia a distintos grupos funcionales, su comportamiento nucleófilo-electrófilo, su carácter 1,3-dipolar (que permite su utilización en reacciones de cicloadición con distintos dipolarófilos) y la fácil eliminación del grupo tosilo, el TosMIC se ha utilizado en numerosas reacciones.<sup>197</sup> Ejemplos de ello son las condensaciones tipo Knoevenagel con aldehídos y cetonas. Además, el TosMIC puede ser mono- o dialquilado fácilmente. Sin embargo, su aplicación más importante ha sido en la síntesis de heterociclos nitrogenados de cinco miembros,<sup>1,195,198</sup> como los mostrados en el **Esquema 4.1** (página 136).

El interés de nuestro grupo de investigación en el TosMIC se remonta a finales de los años 90, cuando se planteó como objetivo la exploración del TosMIC para la síntesis de heterociclos nitrogenados de seis miembros. Se pretendía expandir la química de este compuesto, utilizado hasta esa fecha principalmente en la formación de heterociclos de cinco eslabones, y posteriormente aplicar la metodología desarrollada en un proyecto encaminado a la síntesis total de la Variolina B y análogos este alcaloide como se ha comentado previamente en la introducción (páginas 4-7).

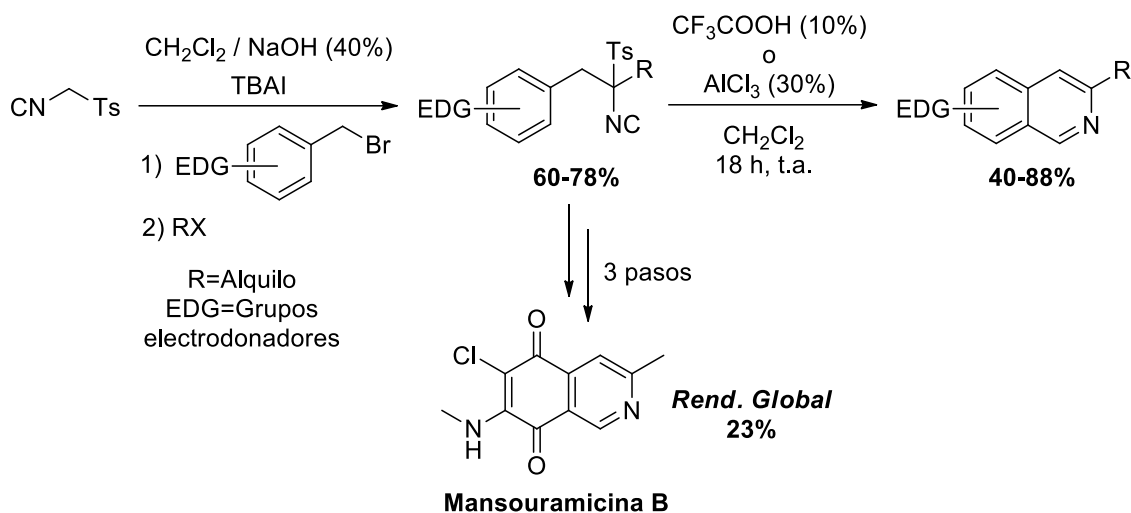
La Dra. Anna Coppola desarrolló su tesis doctoral en el campo de la síntesis de isoquinolinas mediante heterociclaciones con TosMIC.<sup>7</sup> Para ello, en primer lugar sintetizó diversos derivados de  $\alpha$ -arilmetil TosMIC mediante una reacción de dialquilación en condiciones de transferencia de fase utilizando dos haluros alquílicos distintos de forma secuencial en un proceso *one-pot*. A continuación, llevó a cabo la heterociclación de los isonitrilos formados mediante una reacción de sustitución electrófila aromática catalizada por ácidos. Esta metodología constituye un método

<sup>197</sup> Kaur, T.; Wadhwa, P.; Sharma, A. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 52769 – 52787.

<sup>198</sup> Ono, N.; Okujima, T. *Isocyanide Chemistry Applications in Synthesis and Material Science* **2012**, 385–429.



eficiente de síntesis de isoquinolinas en condiciones suaves de reacción y transcurre con buenos rendimientos cuando el anillo de benceno presenta sustituyentes electrodonadores. Además, fue empleada con éxito en la primera síntesis total del alcaloide Mansouramicina B.<sup>8</sup>



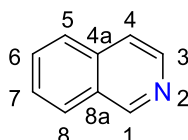
**Esquema 4.3.** Heterociclaciones con TosMIC para la síntesis de isoquinolinas. Aplicación a la síntesis total del alcaloide Mansouramicina B.

## 4.2. PARTE I. HETEROCICLACIÓN DE DERIVADOS DE $\alpha$ -ARILMETIL TOSMIC CON ELECTRÓFILOS: SÍNTESIS DE ISOQUINOLINAS

### 4.2.1. ANTECEDENTES

#### 4.2.1.1. ISOQUINOLINAS. ESTRUCTURA Y APLICACIONES

La isoquinolina es un heterociclo  $\pi$ -deficiente constituido por una piridina fusionada a un anillo bencénico, que presenta una estructura plana y experimenta reacciones con electrófilos preferentemente en las posiciones C4 y C8 y con nucleófilos en C1 y C3.



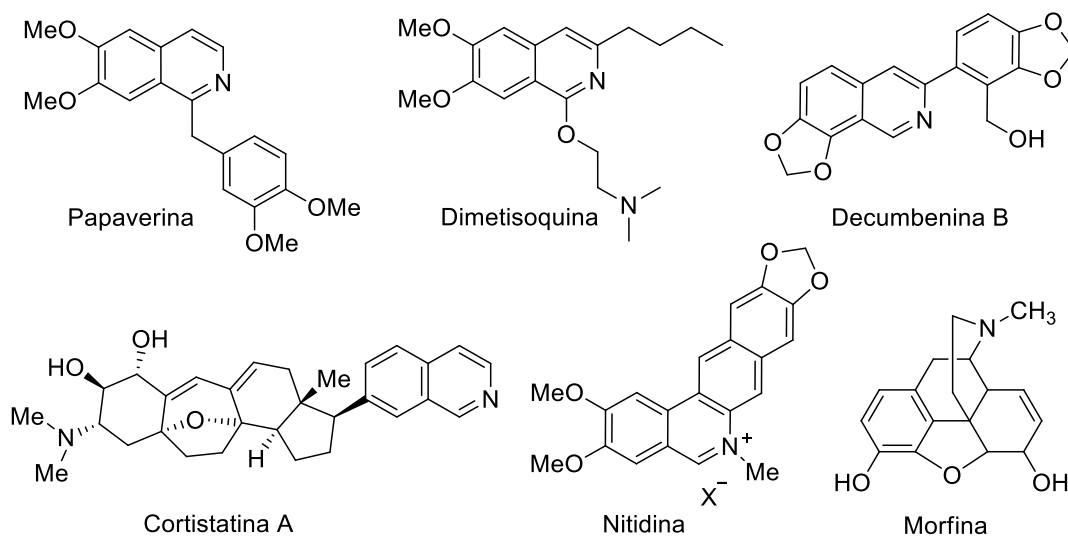
**Figura 4.5.** Estructura de la isoquinolina

Es un heterociclo especialmente importante en química médica, y se encuentra formando parte de la estructura de numerosos productos naturales<sup>199</sup> con un amplio rango de actividades biológicas: antitumorales, antimaláricas, anti-inflamatorias, antihipertensivas, antihistamínicas y fungicidas.<sup>200</sup> Como ejemplos destacados se

<sup>199</sup> Bentley, K.W. *The Isoquinoline Alkaloids*, Hardwood Academic: Amsterdam, Netherlands, **1998**.

<sup>200</sup> (a) Phillipson, J. D.; Roberts, M. F.; Zenk, M. H. Eds. *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*; Springer Verlag: Berlin, **1985**. (b) Menachery, M. D.; Lavanier, G. L.; Wetherly, M. L.; Guinaudeau, H.; Shamma, M. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 745 – 778. (c) Rinehart, K. L. *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 1 – 27. (d) Croisy-Delcey, M.; Croisy, A.; Carrez, D.; Huel, C.; Chiaroni, A.; Ducrot, P.; Bisagni, E.; Jin, L.; Leclercq, G. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2629 – 2641. (e) Weissman, B. A.; Raveh, L. *J. Neurochem.* **2003**, *84*, 432 – 437. (f) Kartsev, V. G. *Med. Chem. Res.* **2004**, *13*, 325 – 336. (g) Dvorak, Z.; Kuban, V.; Klejdus, B.; Hlavac, J.; Vicar, J.; Ulrichova, J.; Simanek, V. *Heterocycles* **2006**, *68*, 2403 – 2422.

pueden mencionar los alcaloides Papaverina<sup>201</sup> (importante vasodilatador y relajante muscular), Dimetisoquina o Quinisocaína (anestésico local), Decumbenina B<sup>202</sup> (potente inhibidor de la contracción espontánea del intestino) y Cortistatina A (fuerte anti-inflamatorio y analgésico empleado contra la artritis reumatoide),<sup>203</sup> así como la Nitidina (antimalárico).<sup>204</sup> También han sido ampliamente utilizados diversos derivados de tetrahidroisoquinolina. Un ejemplo de ello es la morfina, alcaloide derivado del opio cuyo esqueleto contiene una isoquinolina totalmente reducida, utilizado a menudo en medicina como analgésico contra el dolor agudo.



**Figura 4.6.** Estructura de alcaloides isoquinolínicos.

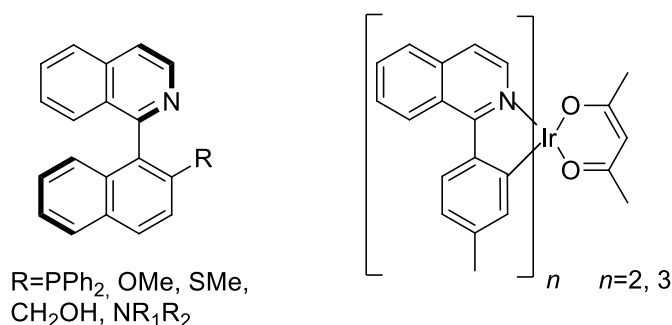
<sup>201</sup> (a) Smith, W. S.; Dowd, C. F.; Johnston, S. C.; Ko, N. U.; DeArmond, S. J.; Dillon, W. P.; Setty, D.; Lawton, M. T.; Young, W. L.; Higashida, R. T.; Halbach, V. V. *Stroke* **2004**, 35, 2518 – 2522. (b) Karatas, A.; Gokce, F.; Demir, S.; Ankarali, S. *Neurosci. Lett.* **2008**, 445, 58 – 61.

<sup>202</sup> (a) Zhang, J.; Zhu, D.; Hong, S. *Phytochemistry* **1995**, 39, 435 – 437. (b) Xu, X.-Y.; Qin, G.-W.; Xu, R.-S.; Zhu, X.-Z. *Tetrahedron* **1998**, 54, 14179 – 14188. (c) Wada, Y.; Nishida, N.; Kurono, N.; Ohkuma, T.; Orito, K. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 4320 – 4327.

<sup>203</sup> Watanabe, Y.; Aoki, S.; Tanabe, D.; Setiawan, A.; Kobayashi, M. *Tetrahedron*, **2007**, 63, 4074 – 4079.

<sup>204</sup> (a) Dyke, S. F.; Sainsbury, M.; Moon, B. J. *Tetrahedron* **1968**, 24, 1467 – 1474. (b) Phillips, S. D.; Castle, R. N. *J. Heterocycl. Chem.* **1981**, 18, 223 – 232. (c) Shulgin, A. T.; Perry, W. E. Eds. *The Simple Plant Isoquinolines*; Transform: London, **2003**.

Por otro lado, algunos derivados de isoquinolinas se han utilizado en distintas aplicaciones alejadas de su uso terapéutico. Un ejemplo de ello es su empleo como ligandos quirales en catálisis asimétrica.<sup>205</sup> En este sentido, compuestos de tipo binaftilo derivados de isoquinolina formados por una isoquinolina unida a un naftaleno por su posición C1 han sido utilizados como ligandos de metales de transición. El más conocido es el *Quinap*, en el cual el sustituyente es un grupo fosfina, y ha sido utilizado en reacciones asimétricas de hidrobtoración, alquilación alílica, cicloadición de Diels-Alder, arilación de enolatos y adiciones de Mannich (**Figura 4.7**).<sup>206</sup> Asimismo, se han empleado complejos de iridio con derivados de isoquinolina como ligandos en la síntesis de OLEDs.<sup>207</sup>



**Figura 4.7.** A la izquierda, ligando quiral derivado de isoquinolina. A la derecha, complejo de iridio con un derivado de isoquinolina utilizado en la síntesis de OLEDs.

<sup>205</sup> (a) Lim, C. W.; Tissot, O.; Mattison, A.; Hooper, M. W.; Brown, J. M.; Cowley, A. R.; Hulmes, D. I.; Blacker, A. J. *Org. Process Res. Dev.* **2003**, 7, 379 – 384. (b) Sweetman, B. A.; Müller-Bunz, H.; Guiry, P. J. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 4643 – 4646. (c) Durola, F.; Sauvage, J.-P.; Wenger, O. S. *Chem. Commun.* **2006**, 171 – 173.

<sup>206</sup> (a) Alcock, N.; Brown, J.; Hulmes, D. *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, 4, 743 – 756. (b) Cortright, S. B.; Huffman, J. C.; Yoder, R. A.; Coalter, J. N.; Johnston, J. N. *Organometallics* **2004**, 23, 2238 – 2250.

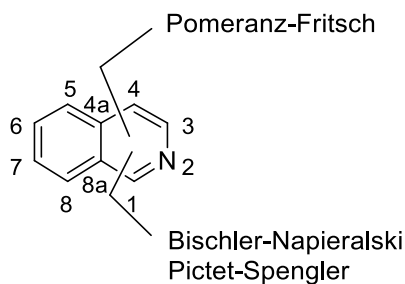
<sup>207</sup> (a) Zhao, Q.; Liu, S.; Shi, M.; Wang, C.; Yu, M.; Li, L.; Li, F.; Yi, T.; Huang, C. *Inorg. Chem.* **2006**, 45, 6152 – 6160. (b) Park, G.Y.; Kim, Y.; Ha, Y. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **2007**, 462, 179 – 188. (c) Shin, I.-S.; Kim, J. I.; Kwon, T.-H.; Hong, J.-I.; Lee, J.-K.; Kim, H. *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111, 2280 – 2286. (d) Ho, C. L.; Wong, W.Y.; Gao, Z.Q.; Chen, C. H.; Cheah, K.W.; Yao, B.; Xie, Z.; Wang, Q.; Ma, D.; Wang, L.; Yu, X.-M.; Kwok, H.-S.; Lin, Z. *Adv. Funct. Mater.* **2008**, 18, 319 – 331. (e) Tamura, Y.; Hisamatsu, Y.; Kumar, S.; Itoh, T.; Sato, K.; Kuroda, R.; Aoki, S. *Inorganic Chemistry* **2017**, 56, 812 – 833.

#### 4.2.1.2. SÍNTESIS DE ISOQUINOLINAS

Debido a la gran variedad de actividades biológicas que presentan numerosos productos naturales con estructuras basadas en este heterociclo, se han desarrollado diversos métodos de síntesis. A continuación se presentan los más representativos, comenzando por las reacciones clásicas y continuando con algunas metodologías sintéticas más novedosas.

##### 4.2.1.2.1. Métodos clásicos de síntesis de isoquinolinas

Se pueden diferenciar tres métodos clásicos de síntesis de isoquinolinas: la reacción de Pomeranz-Fritsch, basada en una desconexión entre los carbonos C4 y C4a y las reacciones de Bischler-Napieralski y Pictet-Spengler, en las cuales la desconexión se produce entre los carbonos C1 y C8a.

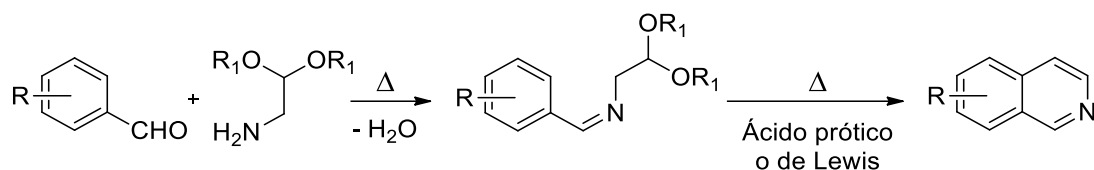


**Figura 4.8.** Métodos clásicos de síntesis de isoquinolinas y desconexiones para cada uno de ellos.

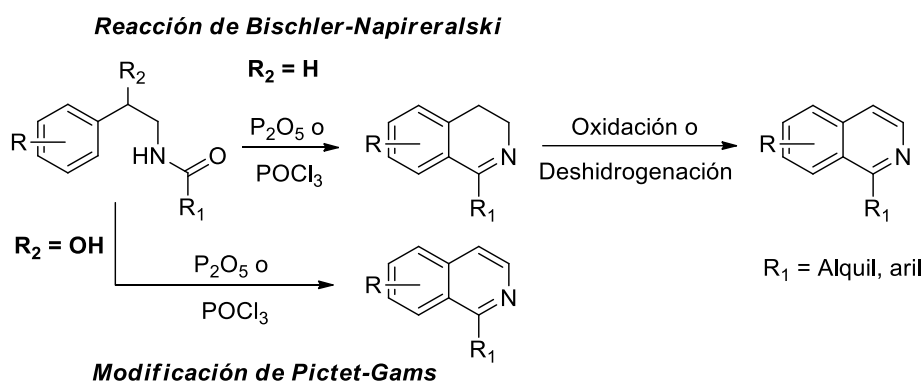
##### A. Reacción de Pomeranz-Fritsch<sup>208</sup>

La reacción de Pomeranz-Fritsch conlleva dos pasos de reacción: condensación de un aldehído aromático con un aminoacetal y ciclación del benzalaminoacetal resultante por tratamiento con un ácido fuerte. Al utilizar cetonas en lugar de aldehídos, el rendimiento desciende considerablemente, lo cual limita esta síntesis a la formación de isoquinolinas totalmente aromatzadas sin sustituyentes en el anillo de piridina.

<sup>208</sup> (a) Pomeranz, C. *Monatsh. Chem.* **1893**, 14, 116 – 119. (b) Fritsch, P. *Chem. Ber.* **1893**, 26, 419 – 422.

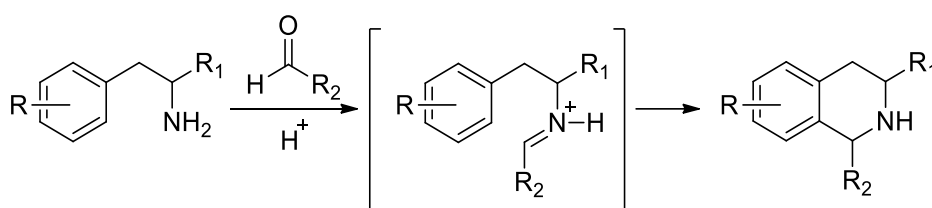
**Esquema 4.4.** Reacción de Pomeranz-Fritsch.**B. Reacción de Bischler-Napieralski**<sup>209</sup>

Este método consiste en la ciclación de *N*-acil-β-ariletilaminas con agentes deshidratantes (generalmente P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> o POCl<sub>3</sub>) para formar 1-alquil o 1-aril 3,4-dihidroisoquinolinas, seguida de una oxidación para proporcionar las isoquinolinas completamente aromatzadas.<sup>210</sup> El paso de ciclación es una sustitución electrófila aromática, que se ve favorecida por la presencia de sustituyentes electrodonadores en el anillo aromático. La modificación de Pictet-Gams<sup>211</sup> parte de *N*-acil-β-ariletilaminas con un grupo hidroxilo en posición β respecto al grupo amino de forma que, al ser tratadas con P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> o POCl<sub>3</sub>, se produce una deshidratación adicional, permitiendo acceder a isoquinolinas completamente aromatzadas sin necesidad de un paso posterior de oxidación (**Esquema 4.5**).

**Esquema 4.5.** Reacción de Bischler-Napieralski y modificación de Pictet-Gams.<sup>209</sup> Bischler, A.; Napieralski, B. *Chem. Ber.* **1893**, 26, 1903 – 1908.<sup>210</sup> Bergstrom, F. W. *Chem. Rev.* **1944**, 35, 77 – 277.<sup>211</sup> Pictet, A.; Gams, A. *Chem. Ber.* **1909**, 42, 2943 – 2952.

### C. Reacción de Pictet-Spengler<sup>212</sup>

Consiste en una reacción de condensación de  $\beta$ -ariletilaminas con aldehídos catalizada por ácidos para proporcionar 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolinas en un proceso *one-pot* que tiene lugar a través de un ion iminio intermedio. Al igual que la reacción de Bischler-Napieralski, transcurre mediante una sustitución electrófila aromática, por lo que se ve favorecida por la presencia de sustituyentes electrodonadores en el anillo aromático. Este método permite la obtención de isoquinolinas con el anillo de piridina totalmente reducido.



Esquema 4.6. Reacción de Pictet-Spengler.

#### 4.2.1.2.2. Nuevas estrategias para la síntesis de isoquinolinas

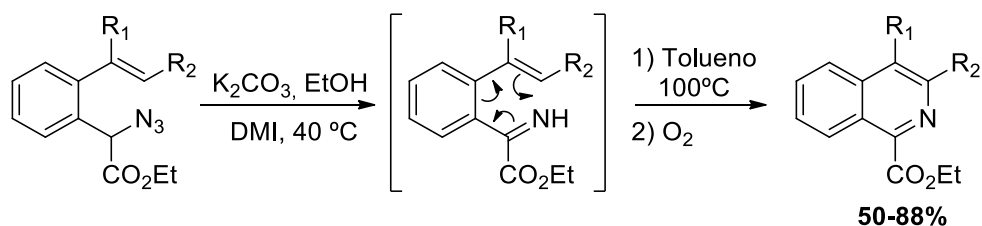
Aunque los métodos clásicos de síntesis de isoquinolinas han sido utilizados para la obtención de una gran variedad de productos naturales, requieren en muchos casos de condiciones de reacción drásticas, lo que hace que se mantenga el interés en el desarrollo de nuevos métodos de síntesis de este heterociclo que resulten eficientes y transcurran en condiciones de reacción suaves. A continuación se describen algunas de las alternativas más interesantes publicadas en los últimos años.

#### A. Reacciones electrocíclicas y cicloadiciones

Como ejemplo de este tipo de reacciones, se puede destacar la síntesis realizada por el grupo de Chiba en 2009<sup>213</sup> mediante una reacción de electrociclación  $6\pi$  de una imina intermedia generada a partir de azidas.

<sup>212</sup> Pictet, A.; Spengler, T. *Chem. Ber.* **1911**, *44*, 2030 – 2036.

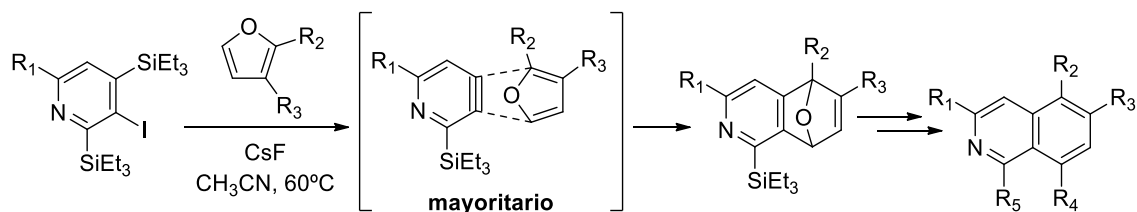
<sup>213</sup> Hui, B. W.; Chiba, S. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 729 – 732.



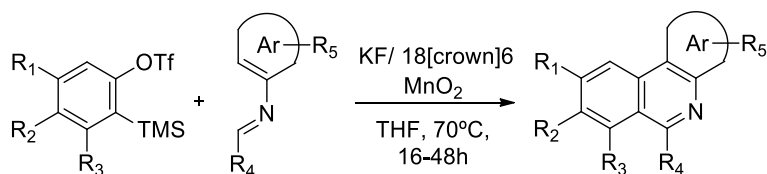
**Esquema 4.7.** Reacción de electrociclación 6 $\pi$  de iminas para la síntesis de isoquinolinas.

Otros ejemplos recientes son las reacciones de Diels-Alder y aza-Diels-Alder desarrolladas recientemente por Ikawa *et al.*<sup>214</sup> y el grupo de Coquerel,<sup>215</sup> respectivamente. Ambas utilizan un arino generado *in situ*, y permiten la obtención de isoquinolinas polisustituidas en el primer caso y fusionadas con arilos en el segundo, con buenos rendimientos.

**A) Reacción Diels-Alder**



**B) Reacción aza-Diels-Alder**



**Esquema 4.8.** Síntesis de isoquinolinas mediante reacciones de A) Diels-Alder regioselectiva y B) aza-Diels-Alder.

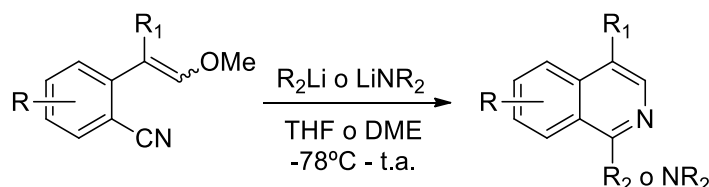
<sup>214</sup> Ikawa, T.; Urata, H.; Fukumoto, Y.; Sumii, Y.; Nishiyama, T.; Akai, S. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 16228 – 16232.

<sup>215</sup> Castillo, J.-C.; Quiroga, J.; Abonia, R.; Rodriguez, J.; Coquerel, Y. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 3374 – 3377.



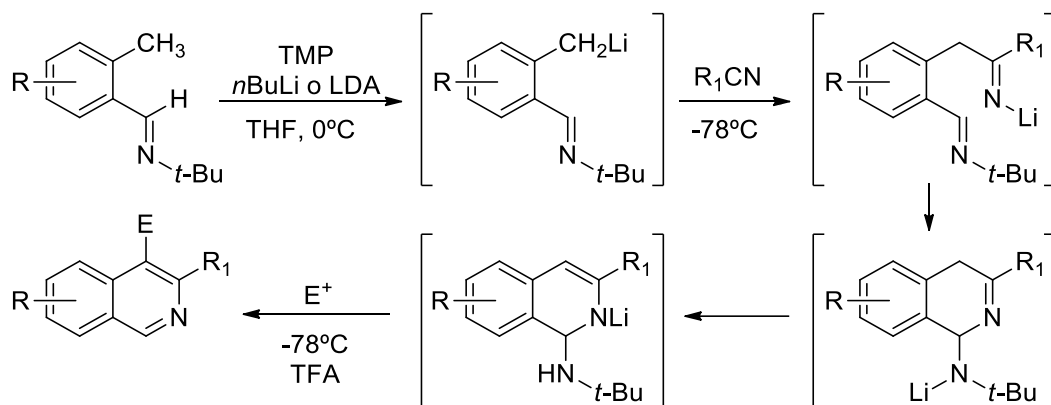
## B. Métodos basados en ciclaciones nucleófilas

En 2004, Kobayashi *et al.*<sup>216</sup> describieron un método de síntesis de isoquinolinas con un sustituyente alquílico, arílico o amino en la posición C1 mediante una reacción de ciclación intramolecular de 2-(2-metoxietenil)benzonitrilos.



**Esquema 4.9.** Síntesis de isoquinolinas 1,4-disustituidas mediante ciclación nucleófila.

En 2011, el grupo de Myers<sup>217</sup> describió una síntesis versátil de isoquinolinas. El tratamiento de *o*-tolualdehído *tert*-butiliminas con una base y su posterior captura con nitrilos da lugar a un intermedio que, tras la adición de un electrófilo, conduce a las correspondientes isoquinolinas.



**Esquema 4.10.** Síntesis de isoquinolinas mediante ciclación nucleófila.

<sup>216</sup> Kobayashi, K.; Shiokawa, T.; Morikawa, O.; Konishi, H. *Chem. Lett.* **2004**, 33, 236 – 237.

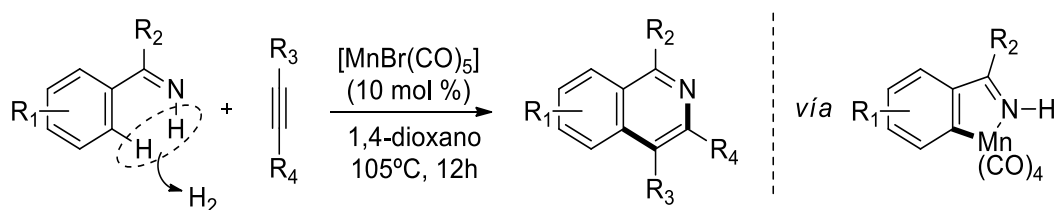
<sup>217</sup> Si, C.; Myers, A. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 10409 – 10413.

### C. Métodos de cierre de anillo catalizados por metales.

Actualmente, las alternativas más interesantes a los métodos clásicos están basadas en reacciones catalizadas por metales de transición. En los últimos años se han comenzado a explorar distintos metales, como cobre, plata, rutenio, rodio y manganeso, además del paladio, como catalizadores de estas reacciones. A continuación se muestran algunos ejemplos.

#### - *Reacciones catalizadas por Mn*

He *et al.* desarrollaron esta *anulación deshidrogenante* [4+2] catalizada por manganeso<sup>218</sup> de N-H iminas y alquinos mediante activación de los enlaces C-H y N-H. La reacción transcurre sin necesidad de aditivos, oxidantes o ligandos, tolera distintos grupos funcionales y permite acceder a isoquinolinas sustituidas con buenos rendimientos.



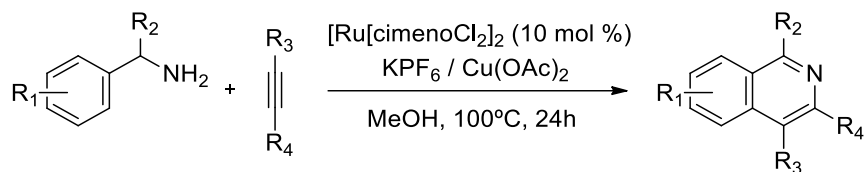
**Esquema 4.11.** Síntesis de isoquinolinas catalizada por Mn.

#### - *Reacciones catalizadas por Ru*

El grupo de Urriolabeitia<sup>219</sup> ha llevado a cabo la síntesis de isoquinolinas mediante una reacción de acoplamiento oxidativo entre bencilaminas y alquinos catalizada por rutenio con buenos rendimientos, utilizando la amina primaria como grupo director.

<sup>218</sup> He, R.; Huang, Z.-T.; Zheng, Q.-Y.; Wang, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 4950 – 4953.

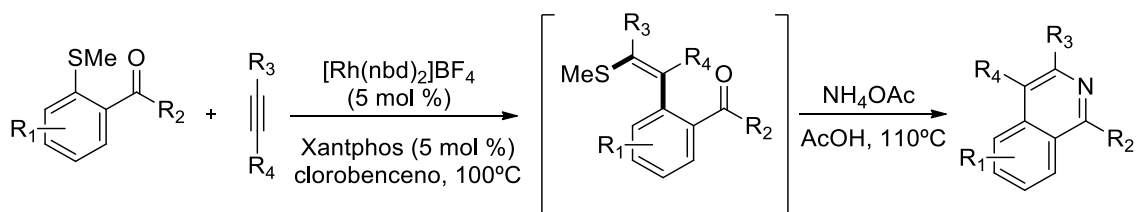
<sup>219</sup> Villuendas, P.; Urriolabeitia, E. P. *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 5254 – 5263.



**Esquema 4.12.** Síntesis de isoquinolinas mediante catálisis con Ru.

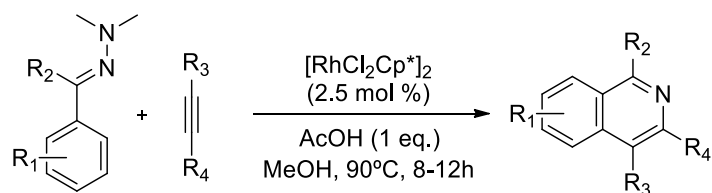
- **Reacciones catalizadas por Rh**

El grupo de Willis<sup>220</sup> utilizó una estrategia de carbotilación catalizada por Rh(I). Partiendo de cetonas aromáticas con un grupo metiltio en orto, se llevó a cabo una carbotilación de alquinos y, por tratamiento con una fuente de amonio, se obtuvieron isoquinolinas sustituidas.



**Esquema 4.13.** Síntesis de isoquinolinas catalizada por Rh(I).

El grupo de Cheng<sup>221</sup> utilizó un catalizador de Rh(III) para la activación de enlaces C–H utilizando hidrazona como grupo oxidante director.

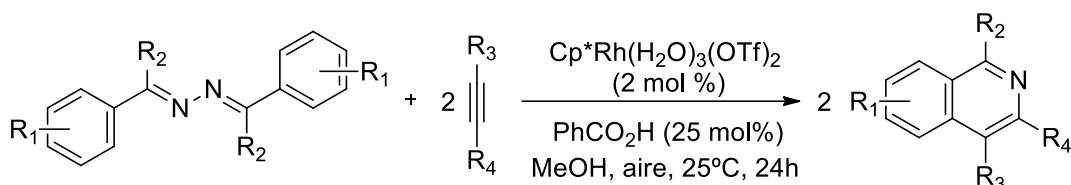


**Esquema 4.14.** Síntesis de isoquinolinas catalizada por Rh(III).

<sup>220</sup> Arambasic, M.; Hooper, J. F.; Willis, M. C. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5162 – 5165.

<sup>221</sup> Chuang, S.-C.; Gandeepan, P.; Cheng, C.-H. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5750 – 5753.

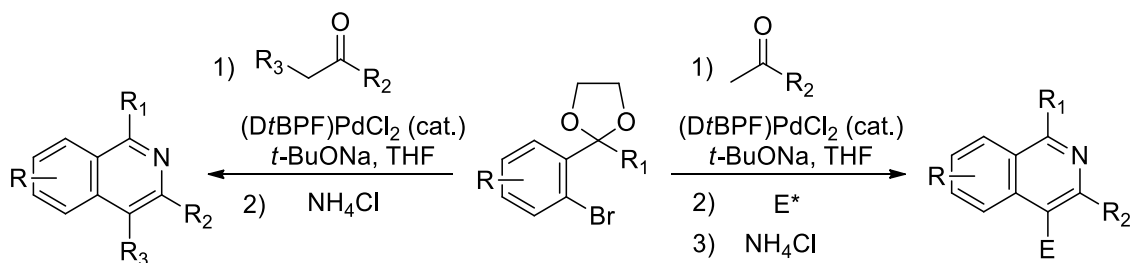
El grupo de Huang<sup>222</sup> llevó a cabo el acoplamiento cruzado de azinas y alquinos mediante una activación secuencial oxidativa de los enlaces C–H y N–N catalizada por Rh(III), utilizando como oxidante interno el enlace N–N de la azina.



**Esquema 4.15.** Síntesis de isoquinolinas catalizada por Rh(III) a temperatura ambiente.

- *Reacciones catalizadas por Pd*

Donohoe *et al.*<sup>223</sup> llevaron a cabo una síntesis modular de isoquinolinas catalizada por paladio. Mediante la combinación de una metil cetona, un bromuro arílico y cloruro amónico en una reacción multicomponente se obtuvieron isoquinolinas sustituidas en distintas posiciones con rendimientos globales de hasta un 80%. En trabajos posteriores incluyeron un electrófilo en la reacción, obteniendo isoquinolinas con el electrófilo como sustituyente en la posición C4.



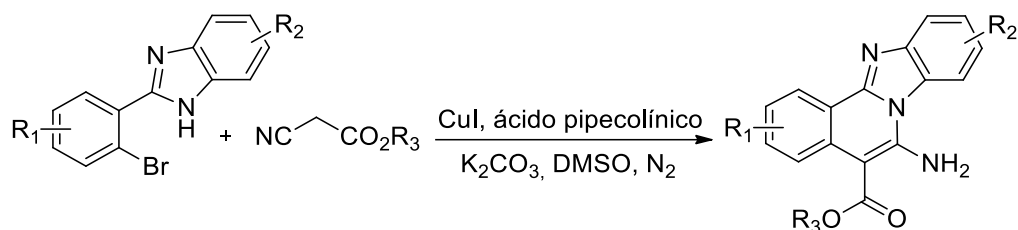
**Esquema 4.16.** Síntesis de isoquinolinas catalizada por Pd.

<sup>222</sup> Han, W.; Zhang, G.; Li, G.; Huang, H. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 3532 – 3535.

<sup>223</sup> (a) Donohoe, T. J.; Pilgrim, B. S.; Jones, G. R.; Bassuto, J. A. *PNAS* **2012**, *109*, 11605 – 11608. (b) Pilgrim, B. S.; Gatland, A. E.; McTernan, C. T.; Procopiu, P. A.; Donohoe, T. J. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 6190 – 6193.

- **Reacciones catalizadas por Cu**

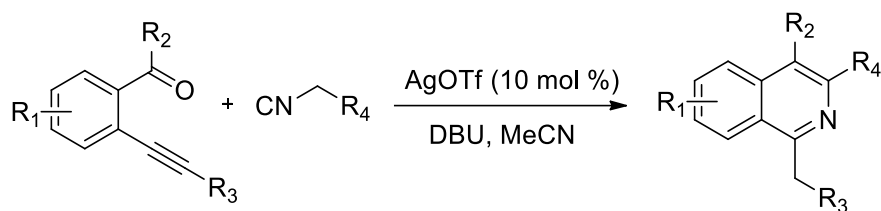
El grupo de Fu<sup>224</sup> desarrolló un método basado en una reacción en cascada catalizada por cobre que utiliza derivados de nitrilos para obtener benzoimidazoisquinolinas.



**Esquema 4.17.** Síntesis de benzoimidazoisquinolinas catalizada por Cu.

- **Reacciones catalizadas por Ag**

En 2012, Wu<sup>225</sup> desarrolló un método de obtención de isoquinolinas partiendo de 2-alquinilbenzaldehídos y 2-isocianoacetatos, utilizando en este caso Ag(I) como catalizador.



**Esquema 4.18.** Síntesis de isoquinolinas catalizada por Ag.

<sup>224</sup> Lu, J.; Fu, H. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 4600 – 4605.

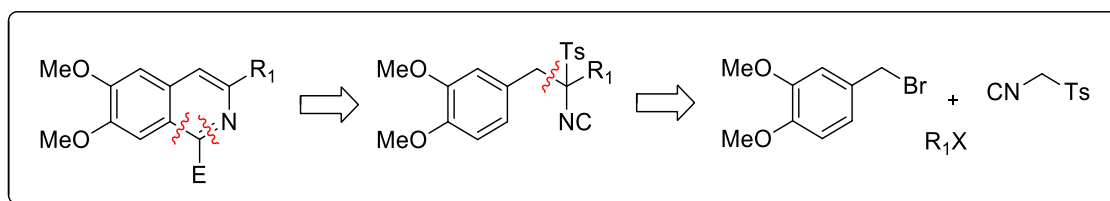
<sup>225</sup> Zheng, D.; Li, S.; Wu, J. *Org. Lett.* **2012**, 14, 2655 – 2657.

### 4.2.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como continuación del trabajo realizado por la Dra. Anna Coppola en la síntesis de isoquinolinas mediante ciclación de derivados de  $\alpha$ -arilmetil TosMIC catalizada por ácidos, este proyecto plantea la heterociclación de estos derivados en presencia de distintos electrófilos, lo que posibilitaría la obtención de isoquinolinas 1,3-disustituídas. Estas ciclaciones tendrán lugar a través de un proceso de sustitución electrófila aromática, por lo que la formación de la isoquinolina estará favorecida cuando el grupo bencilo presente sustituyentes electrodonadores en el anillo bencénico.

Esta metodología aprovecha el carácter ambivalente del carbono del grupo isonitrilo, que puede actuar al mismo tiempo como nucleófilo y como electrófilo. De esta forma, la ciclación por sustitución electrófila aromática y el ataque del isocianuro al electrófilo correspondiente ocurrirán como un proceso tándem. Además, presenta como ventajas respecto a otras síntesis descritas la sencillez de la reacción y la ausencia de metales en el proceso, lo cual es altamente deseable, especialmente en la síntesis de productos bioactivos y fármacos.

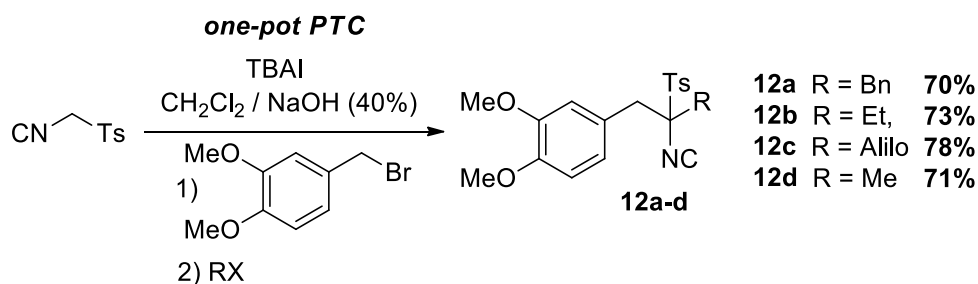
A continuación se presenta el esquema retrosintético planteado para la obtención de isoquinolinas 1,3-disustituídas.



**Esquema 4.19.** Esquema retrosintético para la síntesis de isoquinolinas 1,3-disustituídas.

#### 4.2.2.1. Síntesis de los derivados de $\alpha$ -arilmetil TosMIC

En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis de los derivados de  $\alpha$ -arilmetil TosMIC necesarios para la posterior ciclación mediante una reacción de transferencia de fase (PTC, *Phase Transfer Catalysis*). En un medio bifásico [ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{NaOH}$  (40%)] en presencia de ioduro de tetrabutilamonio (TBAI) como catalizador de transferencia de fase, se hizo reaccionar secuencialmente el TosMIC con dos haluros de alquilo distintos.<sup>8</sup> En primer lugar se adicionó el bromuro de 3,4-dimetoxibencilo<sup>226</sup> a 0 °C para evitar la formación de derivados dibencilados, y posteriormente el otro haluro de alquilo a temperatura ambiente. De este modo, en un proceso *one-pot*, se sintetizaron los isonitrilos **12a-d** con buenos rendimientos.

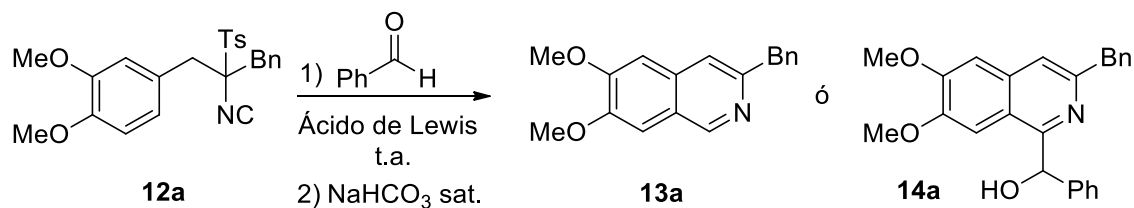


**Esquema 4.20.** Síntesis de los derivados de  $\alpha$ -arilmetil TosMIC **12a-d**.

#### 4.2.2.2. Reacciones con electrófilos

Una vez sintetizados los derivados de  $\alpha$ -arilmetil TosMIC, se seleccionaron distintos electrófilos para la reacción de ciclación. Teniendo en cuenta la reactividad de los isonitrilos, ya comentada en el apartado de *Antecedentes* de este capítulo, estas reacciones se realizaron en presencia de un ácido de Lewis, ya que se ha descrito que aumentan la electrofilia del isonitrilo y, por tanto, favorecen los ataques nucleófilos sobre su carbono terminal.<sup>190</sup> En la **Tabla 4.1** se presenta la optimización de las condiciones de reacción, utilizando como sustrato modelo el derivado de TosMIC **12a** y benzaldehído como electrófilo.

<sup>226</sup> Feng, L.; Lv, K.; Liu, M.; Wang, S.; Zhao, J.; You, X.; Li, S.; Cao, J.; Guo, H. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 55, 125 – 136.

**Tabla 4.1.** Optimización de las condiciones de heterociclación de **12a**.

Entrada	Ácido de Lewis	Equivalentes	Disolvente	Rendimiento 13a/14a (%)
1	AlEt <sub>2</sub> Cl	1.4	THF	0/0 <sup>a</sup>
2	AlEt <sub>2</sub> Cl	1.4	CH <sub>3</sub> CN	0/35
3	AlEt <sub>2</sub> Cl	2.0	CH <sub>3</sub> CN	0/37
4	AlEt <sub>2</sub> Cl	2.0	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0/80
5	AlCl <sub>3</sub>	1.0	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	55/0
6	Yb(OTf) <sub>3</sub>	1.0	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	43/0

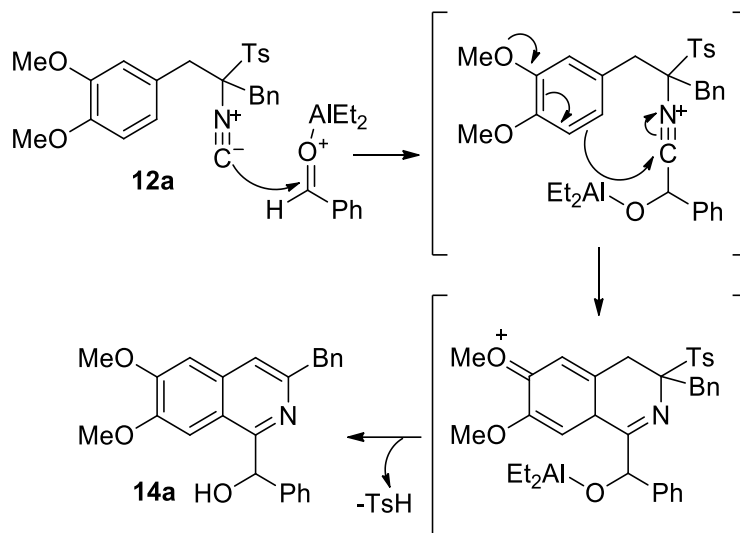
<sup>a</sup>Se recuperó el producto de partida. La reacción se llevó a cabo durante 18 h a temperatura ambiente en todos los casos, utilizando 2 equivalentes de benzaldehído. Tras la ciclación, fue necesario un tratamiento básico de la mezcla de reacción (disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub>) para la aromatización del anillo piridínico.

Mientras que el empleo de AlCl<sub>3</sub> ó Yb(OTf)<sub>3</sub> llevó a la formación de la 3-bencil-3,4-dimetoxiisoquinolina **13a** siguiendo un mecanismo de catálisis ácida ya descrito por el grupo<sup>8</sup> en el cual el aldehído no está involucrado, el uso de cloruro de dietilaluminio en acetonitrilo condujo a la obtención de la isoquinolina 1,3-disustituída deseada **14a** como único producto de la reacción. El rendimiento de esta reacción aumentó a un 80% al utilizar 2 equivalentes de este ácido de Lewis y diclorometano como disolvente.

Este resultado fue racionalizado mediante una hipótesis mecanística que implica en un proceso único la ciclación del derivado de TosMIC mediante una sustitución



electrófila aromática y el ataque del isonitrilo al aldehído. La eliminación del ácido *p*-toluensulfónico conduce a la formación del producto final **14a** (**Esquema 4.21**).



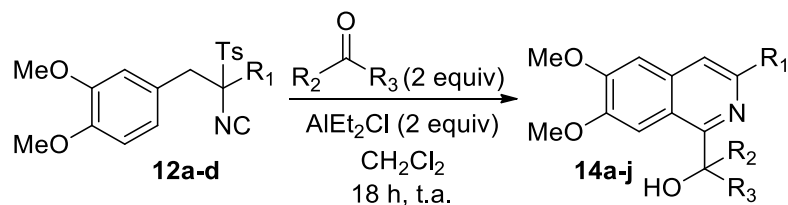
**Esquema 4.21.** Hipótesis mecanística para la formación de la isoquinolina **14a**.

Para lograr el paso final de eliminación de ácido *p*-toluensulfónico es necesario realizar el proceso de tratamiento de la mezcla de reacción y aislamiento (*work-up*) en medio básico utilizando una disolución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$ .

#### 4.2.1.2.1. Reacciones frente a aldehídos y cetonas

Una vez identificadas las mejores condiciones para la reacción de ciclación propuesta, se estudió su alcance utilizando otros derivados de  $\alpha$ -arilmetil TosMIC y distintos aldehídos y cetonas. En todos los casos se emplearon derivados de TosMIC con sustituyentes electrodonadores en el anillo de benceno ya que, según estudios previos realizados por nuestro grupo,<sup>8</sup> estos son necesarios para obtener buenos rendimientos en la heterociclación. Como ejemplos de aldehídos, se utilizaron uno alifático –propionaldehído– y otro aromático –benzaldehído–, y como cetonas, acetona, acetofenona y benzofenona. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos con estos sustratos de partida.

**Tabla 4.2.** Isoquinolinas **14a-j** sintetizadas por reacción de los derivados de TosMIC **12a-d** con aldehídos y cetonas.



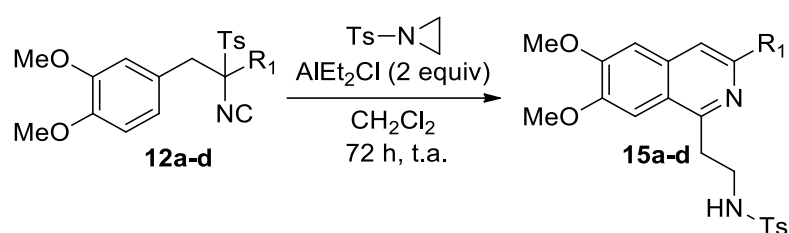
Producto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Rendimiento (%)
<b>14b</b>	Et	H	Ph	99
<b>14c</b>	Alilo	H	Ph	93
<b>14d</b>	Me	H	Ph	94
<b>14e</b>	Bn	H	Et	81
<b>14f</b>	Et	H	Et	81
<b>14g</b>	Bn	Me	Ph	80
<b>14h</b>	Bn	Me	Me	91
<b>14i</b>	Bn	Ph	Ph	54
<b>14j</b>	Me	Ph	Ph	59

La reacción de los isonitrilos **12a-d** con benzaldehído dio lugar a la obtención de las isoquinolinas **14a-d** con rendimientos excelentes. Al utilizar como electrófilos propionaldehído, acetofenona o acetona, los rendimientos disminuyeron pero en todos casos fueron superiores al 80% (**14e-h**). La reacción con benzofenona como electrófilo dio lugar a los compuestos **14i-j** con rendimientos medios, lo que podría atribuirse al mayor impedimento estérico del electrófilo.

#### 4.2.1.2.2. Reacciones frente a *N*-tosilaziridina

Cuando se utilizó *N*-tosilaziridina como electrófilo, la heterociclación también tuvo lugar con conversión total del producto de partida, si bien fueron necesarios tiempos de reacción superiores (72 h). También se observó una mejora en los rendimientos al aumentar el número de equivalentes tanto del electrófilo como del ácido de Lewis (de 2 a 4 equivalentes, **Tabla 4.3**). Con estas condiciones, se sintetizaron las isoquinolinas **15a-d** con buenos rendimientos.

**Tabla 4.3.** Isoquinolinas **15a-d** sintetizadas por reacción de los derivados de TosMIC **12a-d** con *N*-tosilaziridina.

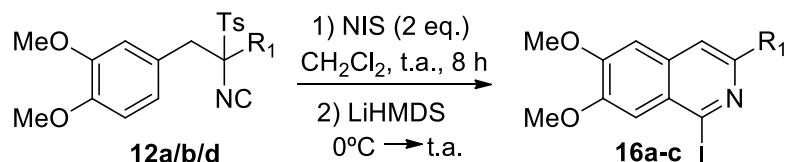


Producto	$\text{R}_1$	<i>N</i> -Tosilaziridina (Equiv.)	$\text{AlEt}_2\text{Cl}$ (Equiv.)	Rendimiento (%)
<b>15a</b>	Bn	2	2	68
<b>15b</b>	Et	2	2	31
<b>15c</b>	Alilo	2	2	41
<b>15a</b>	Bn	4	4	94
<b>15b</b>	Et	4	4	99
<b>15c</b>	Alilo	4	4	58
<b>15d</b>	Me	4	4	80

#### 4.2.1.2.3. Reacciones frente a *N*-halosuccinimidas

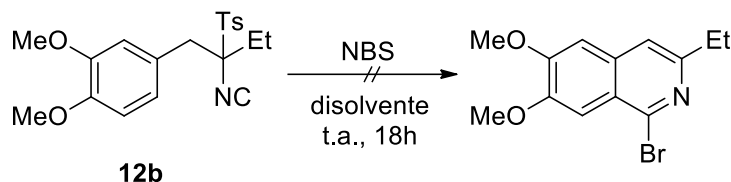
El uso de *N*-iodosuccinimida como electrófilo también condujo a la heterociclación deseada, si bien hubo que realizar algunos pequeños cambios en el procedimiento: no fue necesaria la adición de un ácido de Lewis y requirió un segundo paso bajo condiciones fuertemente básicas (LiHMDS en lugar de NaHCO<sub>3</sub>) para promover la eliminación de ácido *p*-toluensulfónico y la correspondiente aromatización del anillo heterocíclico. Así, la adición de 2 equivalentes de NIS al derivado de TosMIC **12a** y un posterior tratamiento a 0 °C con una disolución de LiHMDS en *tert*-butil metil éter dio lugar a la formación de la isoquinolina **16a** con un rendimiento del 96%. Resultados similares fueron obtenidos para los derivados de TosMIC **12b** y **12d**.

**Tabla 4.4.** Isoquinolinas **16a-c** sintetizadas por reacción de los derivados de TosMIC **12a/b/d** con *N*-iodosuccinimida.



Producto	R <sub>1</sub>	Rendimiento (%)
<b>16a</b>	Bn	96
<b>16b</b>	Et	84
<b>16c</b>	Me	71

También se trató de realizar la ciclación utilizando *N*-bromosuccinimida como electrófilo, obteniéndose en todos los casos descomposición del producto de partida.

**Tabla 4.5.** Condiciones de reacción ensayadas para la reacción de heterociclación de **12b** con NBS.

Entrada	Disolvente	Catalizador	Rendimiento
<b>1</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	---	Descomposición
<b>2</b>	CH <sub>3</sub> CN	FeCl <sub>3</sub>	Descomposición
<b>3</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	FeCl <sub>3</sub>	Descomposición
<b>4</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	FeCl <sub>3</sub> /AlEt <sub>2</sub> Cl	Descomposición

Como resumen de este trabajo, se puede indicar que se ha desarrollado una metodología eficaz para la síntesis de isoquinolinas 1,3-disustituidas. La síntesis sólo es viable cuando los derivados de  $\alpha$ -arilmetil TosMIC presentan sustituyentes electrodonadores en el anillo de benceno, y transcurre con elevados o aceptables rendimientos cuando se utilizan como electrófilos aldehídos, cetonas, *N*-tosilaziridina y *N*-iodosuccinimida. Sin embargo, pruebas realizadas con *N*-bromosuccinimida, epóxidos o aceptores de Michael no dieron lugar a las isoquinolinas deseadas, obteniéndose como productos de la reacción el material de partida inalterado en unos casos y una mezcla de productos de descomposición en otros.

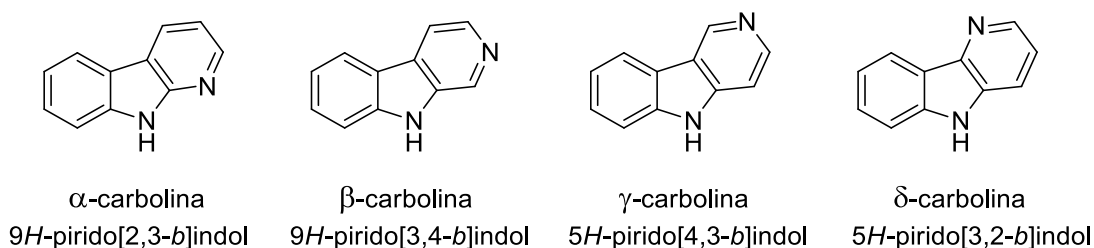
### 4.3. PARTE II. HETEROCICLACIÓN DE DERIVADOS DE $\alpha$ -METILINDOLIL TOSMIC CON ÁCIDOS Y ELECTRÓFILOS: SÍNTESIS DE $\gamma$ -CARBOLINAS

#### 4.3.1. ANTECEDENTES

##### 4.3.1.1. CARBOLINAS

##### 4.3.1.1.1. Estructura

Las carbolinas, o pirido[x,y,b]índoles, son un grupo de heterociclos nitrogenados que forman parte de numerosos productos naturales y compuestos bioactivos. Su estructura está formada por un indol fusionado a un anillo de piridina en distintas posiciones. Dependiendo de la posición que ocupe el nitrógeno en el anillo de piridina, se pueden diferenciar 4 posibles isómeros (**Figura 4.9**).



**Figura 4.9.** Estructura de las carbolinas.

##### 4.3.1.1.2. Actividad biológica

Mientras que las estructuras de  $\alpha$ - y  $\delta$ -carbolinas son raras en la naturaleza y poco relevantes en compuestos bioactivos, las  $\beta$ - y  $\gamma$ -carbolinas muestran actividades biológicas interesantes. Por ello, estos antecedentes se centrarán principalmente en la revisión de las dos últimas.

### *Actividad biológica de las $\beta$ -carbolinas*

Un gran número de productos naturales contienen en su esqueleto el núcleo  $\beta$ -carbolina.<sup>227</sup> Algunos como la harmina (**Figura 4.10**) se producen de forma endógena en los humanos. Otros han sido aislados como metabolitos secundarios de plantas e invertebrados marinos y contienen distintos grupos funcionales que les confieren un amplio rango de propiedades bioquímicas y farmacológicas.<sup>228</sup> Es el caso de la Eudistomina U, que se une al DNA y muestra actividad antibacteriana,<sup>229</sup> la Hirtioerectina A y la Placortarmina D,<sup>230</sup> citotóxicas en líneas de celulares humanas de cáncer cervical y de colon respectivamente,<sup>231</sup> la Fascaplisina, que presenta efectos citotóxicos frente a un amplio rango de líneas celulares tumorales,<sup>232</sup> y la Annomontina, con actividad analgésica, antiinflamatoria y ansiolítica así como un efecto antileishmánico.<sup>233</sup> Las Manzaminas son otro ejemplo de alcaloides naturales con un esqueleto de  $\beta$ -carbolina que muestran un amplio espectro de actividades biológicas como antitumorales, antileishmánicas, antimaláricas y antituberculosas.<sup>234</sup>

<sup>227</sup> Devi, N.; Singh, D.; Kaur, G.; Mor, S.; Putta, V. P. R. K.; Polina, S.; Malakar, C. C.; Singh, V. *New J. Chem.* **2017**, *41*, 1082 – 1093.

<sup>228</sup> Cao, R.; Peng, W.; Wang, Z.; Xu, A. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 479 – 500.

<sup>229</sup> Badre, A.; Boulanger, A.; Abou-Mansour, E.; Banaigs, B.; Combaut, G.; Francisco, C. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 528 – 533.

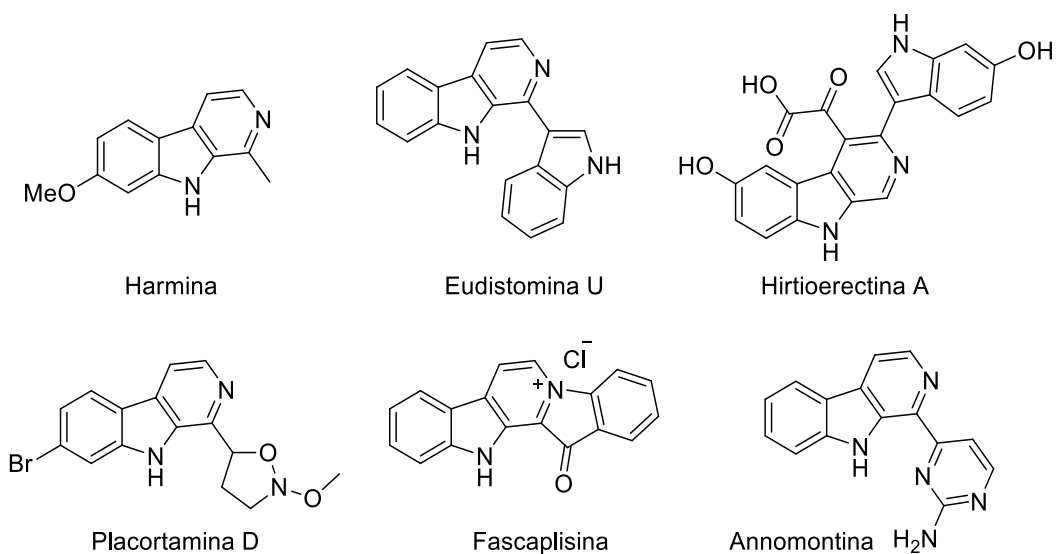
<sup>230</sup> Mulcahy, S. P.; Varelas, J. G. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 6599 – 6601.

<sup>231</sup> (a) Sandler, J. S.; Colin, P.L.; Hooper, J.N.; Faulkner, D.J. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1258 – 1261. (b) Youssef, D. T. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1416 – 1419.

<sup>232</sup> Hamilton, G. *Marine Drugs* **2014**, *12*, 1377 – 1389.

<sup>233</sup> Rejón-Orantes, J. C.; González-Esquinca, A. R.; de la Mora, M. P.; Roldán, G.; Cortés, D. *Planta Med.* **2011**, *77*, 322 – 327.

<sup>234</sup> Ashok, P.; Ganguly, S.; Murugesan, S. *Drug Discovery Today* **2014**, *19*, 1781 – 1791.



**Figura 4.10.** Productos naturales derivados de  $\beta$ -carbolinas con actividad biológica.

Otros derivados de  $\beta$ -carbolinas han mostrado propiedades antivirales,<sup>235</sup> antifúngicas<sup>236</sup> o de inhibición frente a distintas kinasas,<sup>237,238</sup> así como actividades neuroprotectoras. Buen ejemplo de ello es un estudio reciente que sitúa a las  $\beta$ -carbolinas como posibles agentes multifuncionales contra distintos procesos que juegan un rol fundamental en la enfermedad del Alzheimer.<sup>239</sup>

Actualmente se pueden encontrar varios fármacos en el mercado que contienen  $\beta$ -carbolinas en su estructura y han sido comercializados con éxito, como es el caso del

<sup>235</sup> Quintana, V. M.; Piccini, L. E.; Panozzo Zenere, J. D.; Damonte, E. B.; Ponce, M. A.; Castilla, V. *Antiviral Research* **2016**, 134, 26 – 33.

<sup>236</sup> Olmedo, G. M.; Cerioni, L.; Gonzalez, M. M.; Cabrerizo, F. M.; Rapisarda, V. A.; Volentini, S. I. *Food Microbiology* **2017**, 62, 9 – 14.

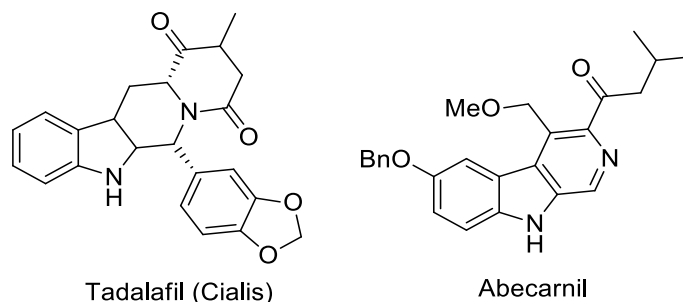
<sup>237</sup> (a) Okamoto, T.; Akase, T.; Izumi, S.; Inaba, S.; Yamamoto, H. Japanese patent 7 220 196; *Chem. Abstr.* **1972**, 77, 152142. (b) Winters, J.; Di Mola, N. West German patent 2 442 513; *Chem. Abstr.* **1975**, 82, 156255. (c) Barun, O.; Patra, P. K.; Ila, H.; Junjappa, H. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 3797 – 3800.

<sup>238</sup> Higgins, J.; Patnaik, D.; Ulyanova, N.; Stein, R. L.; Xian, J.; Glicksman, M.; Cuny, G. D. *U.S. Pat. Appl. Publ.* **2013**, US 20130231360 A1 20130905.

<sup>239</sup> Horton, W.; Sood, A.; Peerannawar, S.; Kugyela, N.; Kulkarni, A.; Tulsan, R.; Tran, C. D.; Soule, J.; Harry LeVine, H.; Török, B.; Török, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27, 232 – 236.



Tadalafil y el Abecarnil, utilizados respectivamente para el tratamiento de la disfunción eréctil y desórdenes del sistema nervioso central (**Figura 4.11**).<sup>240</sup>



**Figura 4.11.** Fármacos derivados de  $\beta$ -carbolina.

### *Actividad biológica de las $\gamma$ -carbolinas*

Las  $\gamma$ -carbolinas también se encuentran en la estructura de distintos productos naturales y varios agentes antitumorales,<sup>241</sup> así como en compuestos con la capacidad de inhibir la actividad de la monoaminooxidasa (MAO) e influir en los efectos causados por neurotransmisores tan importantes como la histamina y la serotonina.<sup>242</sup> Derivados de la 1-amino- $\gamma$ -carbolina han mostrado características de antagonistas de receptores de urotensina del subtipo II, implicada en una serie de enfermedades cardiorenales y desórdenes metabólicos que incluyen hipertensión arterial, insuficiencia cardíaca, aterosclerosis y diabetes (**Figura 4.12**).<sup>243</sup> Algunas 1-amino- y 1-hidroxi- $\gamma$ -carbolinas aromáticas exhiben actividad inhibitoria respecto a kinasas y pueden ser utilizadas para

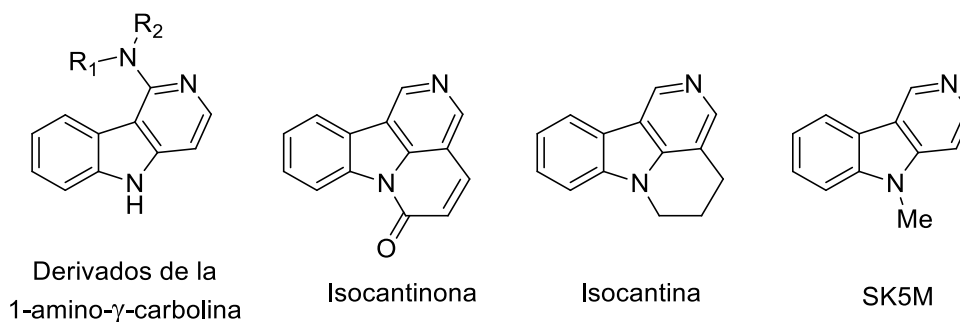
<sup>240</sup> (a) Turski, L.; Stephens, D. N.; Jensen, L. H.; Peterson, E. N.; Meldrum, B. S.; Patel, S.; Hansen, J. B.; Loscher, W.; Schneider, H. H.; Schmiechen, R. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, 253, 344 – 352. (b) Sorbera, L. A.; Martin, L.; Leeson, P. A.; Castañer, J. *Drugs Future* **2001**, 26, 15 – 19. (c) Daugan, A.; Grondin, P.; Ruault, C.; de Gouville, A.-C. L. M.; Coste, H.; Kirilovsky, J.; Hyafil, F.; Labaudiniere, R. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 4525 – 4532. (d) Maw, G. N.; Allerton, C. M.; Gbekor, E.; Million, W. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 1425 – 1428.

<sup>241</sup> Alekseyev, R. S.; Kurkin, A. V.; Yurovskaya, M. A. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2009**, 45, 889 – 925.

<sup>242</sup> Nantka-Namirski, P. *Acta Pol. Pharm.* **1961**, 18, 391 – 399.

<sup>243</sup> Wang, Y.; Wu, Z.; Cuida, B. F.; Lawrence, S. K.; Neeb, M. J.; Rivero, R. A.; Douglas, S. A.; Jin, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 4936 – 4939.

el tratamiento de enfermedades mieloproliferativas y cáncer.<sup>244</sup> Otros derivados presentan actividad antimicrobial, como en el caso de la 6-Isocantinona y la Isocantina,<sup>245</sup> o actividad antivirásica contra el virus de la diarrea bovina, el virus de la hepatitis C humana y el de la fiebre amarilla, como es el caso de la 5-metil- $\gamma$ -carbolina (SK5M).<sup>246</sup>



**Figura 4.12.** Derivados de  $\gamma$ -carbolineas con actividad biológica.

Muchos derivados de  $\gamma$ -carbolineas han sido investigados como candidatos a fármacos y algunos de ellos se encuentran en el mercado: el neuroléptico carbidina (Carbidinum), los antihistamínicos dimebon (Dimebonum) y diazolina (Diazolium u Omeril), los antipsicóticos Flutrolina y Gevotrolina y el antiarrítmico Stobadina.<sup>247</sup> El Dimebon además mostró buenas propiedades como potenciador de la función cognitiva en tests *in vivo* para un modelo neurotóxico de Alzheimer (AD)<sup>248</sup> y ha pasado con éxito los ensayos clínicos iniciales en pacientes con esta enfermedad neurodegenerativa, por lo ha sido promocionado como un nuevo fármaco para su tratamiento.<sup>249</sup>

<sup>244</sup> Truchon, J.-F.; Lachance, N.; Lau, C.; Leblanc, Y.; Mellon, C.; Roy, P.; Isabel, E.; Otte, R. D.; Young, J. R. Int. Pat. WO2007/061764.

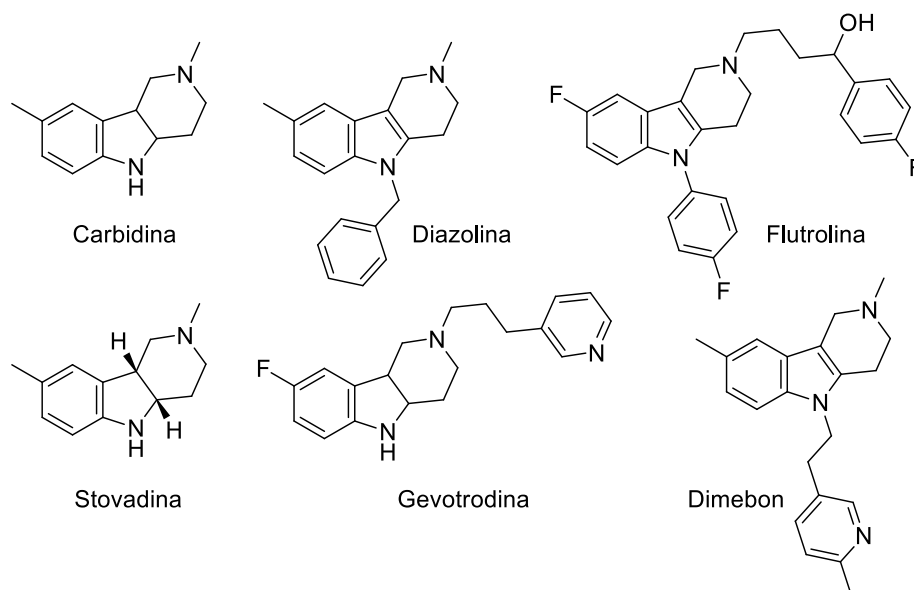
<sup>245</sup> Snyder, S. A.; Vosburg, D. A.; Jarvis, M. G.; Markgraf, J. H. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 5329.

<sup>246</sup> Sako, K.; Aoyama, H.; Sato, S.; Hashimoto, Y.; Baba, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 3780 – 3790.

<sup>247</sup> Alekseyev, R. S.; Kurkin, A. V.; Yurovskaya, M. A. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2011**, *46*, 1169 – 1198.

<sup>248</sup> (a) Bachurin, S. O. *Vopr. Med. Khim.* **2001**, *2*, 1 – 21. (b) Ivanov, Y. Y.; Afanas'ev, A. Z.; Bachurin, S. O. *Khim. Farm. Zh.* **2001**, *35*, 7 – 8.

<sup>249</sup> Smirnova, O. B.; Golovko, T. V.; Granik, V. G. *Pharm. Chem. J.* **2011**, *44*, 654 – 678.



**Figura 4.13.** Derivados de  $\gamma$ -carbolas comercializados como fármacos.

#### 4.3.1.2. SÍNTESIS DE CARBOLINAS

A continuación se presentan los métodos de síntesis de carbolas, tanto los más tradicionales como algunas metodologías sintéticas alternativas desarrolladas recientemente.

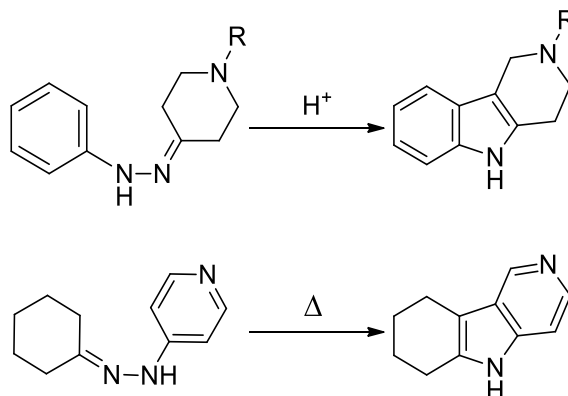
##### 4.3.1.2.1. Síntesis de carbolas a partir de derivados de piridina

Las síntesis clásicas más comúnmente utilizadas para la obtención de carbolas son las reacciones de Fischer y Graebe-Ullmann.

##### A) *Reacción de Fischer*

Es el método más común y versátil para la obtención de tetrahydrocarbolas y, más concretamente,  $\gamma$ -carbolas. Existen dos variantes de esta reacción. La primera consiste en la ciclación catalizada por ácidos de fenilhidrazonas de *N*-alquil-4-piperidinonas y conduce a la formación de  $\gamma$ -carbolas con el anillo piridínico reducido y un grupo alquilo unido al nitrógeno del mismo. La segunda se basa en la ciclación

térmica de la [2-(4-piridinil)hidrazona]ciclohexanona, permitiendo obtener  $\gamma$ -carbolinas con el anillo bencénico reducido.<sup>250</sup>



**Esquema 4.22.** Síntesis de Fischer para la obtención de tetrahydro- $\gamma$ -carbolinas.

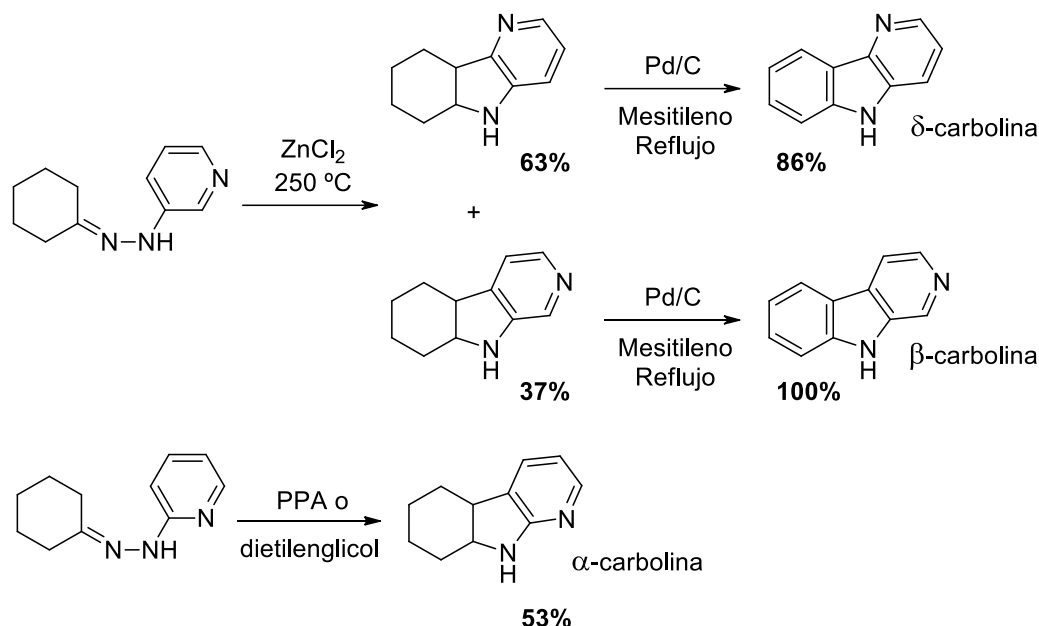
La aplicación de la reacción de Fischer a la síntesis de otras carbolinas no es tan habitual. Basándose en ella, Abramovitch *et al.*<sup>251</sup> obtuvieron una mezcla de tetrahydroderivados de  $\delta$ -carbolina y, en menor proporción, del isómero  $\beta$ . Ambos isómeros en condiciones de deshidrogenación generan las  $\delta$ - y  $\beta$ -carbolinas completamente aromatzadas (**Esquema 4.23**). La tetrahydro- $\alpha$ -carbolina se puede obtener también adaptando la reacción de Fischer en presencia de ácido polifosfórico<sup>252</sup> o dietilenglicol.<sup>253</sup>

<sup>250</sup> Smirnova, O. B.; Golovko, T. V.; Granik, V. G. *Pharm. Chem. J.* **2011**, 45, 389 – 400.

<sup>251</sup> Abramovitch, R. A.; Adams, K. A. H. *Can. J. Chem.* **1962**, 40, 864 – 869.

<sup>252</sup> Okuda, S.; Robison, M. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 740 – 743.

<sup>253</sup> Kelly, A. H.; Parrick, J. *Can. J. Chem.* **1966**, 44, 2455 – 2459.



**Esquema 4.23.** Reacción de Fischer para la obtención de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\delta$ -carbolas.

### B) Reacción de Graebe-Ullmann

Este método alternativo para la síntesis de  $\gamma$ -carbolas consiste en la descomposición térmica,<sup>254</sup> por irradiación por microondas,<sup>255</sup> fotólisis<sup>256</sup> o calentamiento en presencia de ácidos fosfóricos<sup>257,258</sup> o polifosfóricos<sup>259,260</sup> de 1-(4-piridil)benzotriazoles sustituidos o 1-feniltiazol[4,5-*c*]piridinas.

<sup>254</sup> Bremer, O. *Ann.* **1934**, 514, 279 – 291.

<sup>255</sup> Molina, A.; Vaquero, J. J.; Garcia-Navio, J. L.; Alvarez-Builla, J. *Tetrahedron* **1993**, 34, 2673 – 2676.

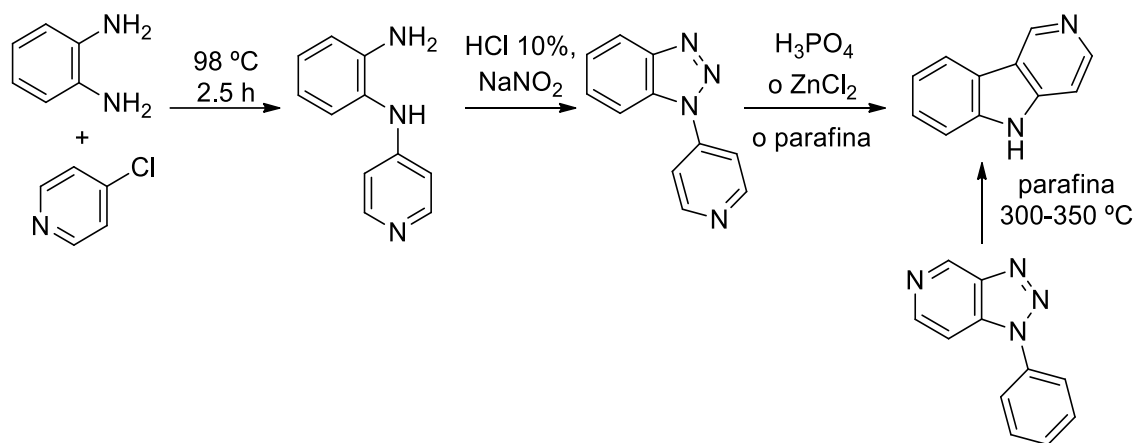
<sup>256</sup> Mehta, L. K.; Parrick, J.; Payne, F. J. *Chem. Soc. Perkin Trans 1*, **1993**, 11, 1261 – 1267.

<sup>257</sup> Robinson, R.; Thornley, S. J. *Chem. Soc.* **1924**, 125, 2169 – 2176.

<sup>258</sup> Nantka-Namirski, P. *Acta Pol. Pharm.* **1961**, 18, 449 – 460.

<sup>259</sup> (a) Nantka-Namirski, P. *Acta Pol. Pharm.* **1961**, 18, 391 – 399. (b) Nantka-Namirski, P. *Acta Pol. Pharm.* **1962**, 19, 229 – 242. (c) Akimoto, H.; Kawai, A.; Nomura, H.; Nagao, M.; Kawachi, T.; Sugimura, T. *Chem. Lett.* **1977**, 1061 – 1064. (d) Allen, M. S.; Tan, Y. C.; Trudell, M. L.; Narayanan, K.; Schindler, L. R.; Martin, M. J.; Schultz, C.; Hagen, T. J.; Koehler, K. F.; Coddling, P. W.; Skolnick, P.; Cook, J. M. *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 2343 – 2357.

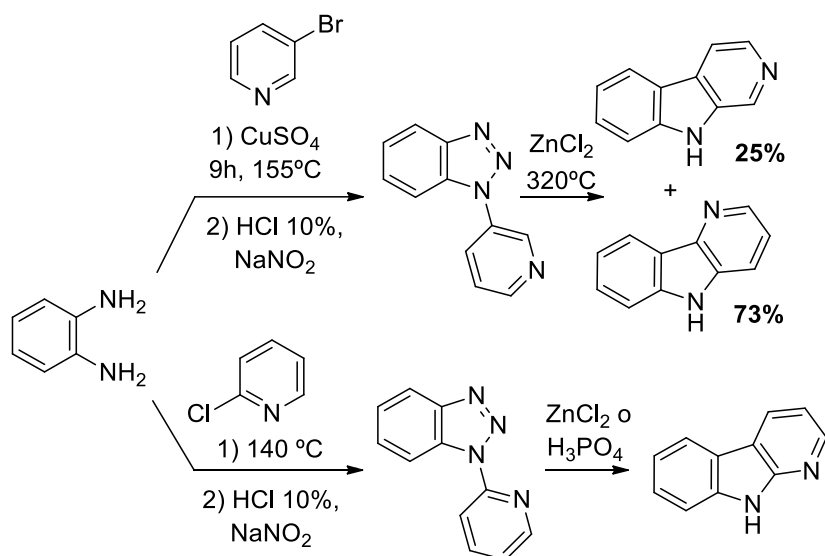
Robinson *et al.*<sup>257</sup> desarrollaron la reacción entre *o*-fenilendiamina y 4-cloropiridina para la obtención de *N*-(2-aminofenil)-4-aminopiridina, cuya diazotación permite la obtención de 1-(4-piridil)benzotriazol. El calentamiento del mismo en ácido fosfórico<sup>258</sup> o cloruro de zinc conduce a la  $\gamma$ -carbolina, que también se puede obtener por irradiación con microondas<sup>260</sup> o descomposición térmica por calentamiento a 300-350 °C en parafina. Este último método también permite la obtención de  $\gamma$ -carbolina partiendo de la 3-fenil-3*H*-pirazolo[3,4-*c*]piridina.



**Esquema 4.24.** Reacción de Graebe-Ullmann para la síntesis de  $\gamma$ -carbolinas.

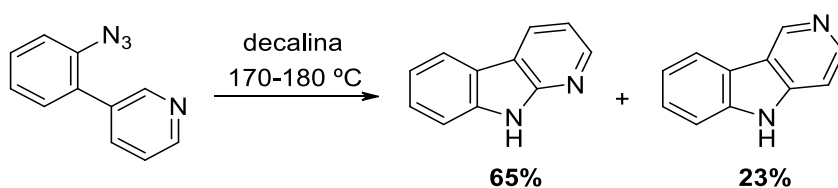
La síntesis de Graebe-Ullmann también fue aplicada a la obtención de una mezcla de  $\beta$ - y  $\delta$ -carbolina partiendo de 3-bromopiridina y de  $\alpha$ -carbolina partiendo de 2-cloropiridina.

<sup>260</sup> Molina, A.; Vaquero, J. J.; García-Navio, J. L. Álvarez-Builla, J.; de Pascual-Teresa, B.; Gago, F.; Rodrigo, M. M.; Ballesteros, M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5587 – 5599.



**Esquema 4.25.** Reacción de Graebe-Ullmann para la síntesis de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\delta$ -carbolinas.

Una variante de la reacción de Graebe-Ullmann es la descomposición de azidas. El calentamiento de 3-(2-azidofenil)piridina en decalina conduce a una mezcla de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -carbolinas.<sup>261</sup>

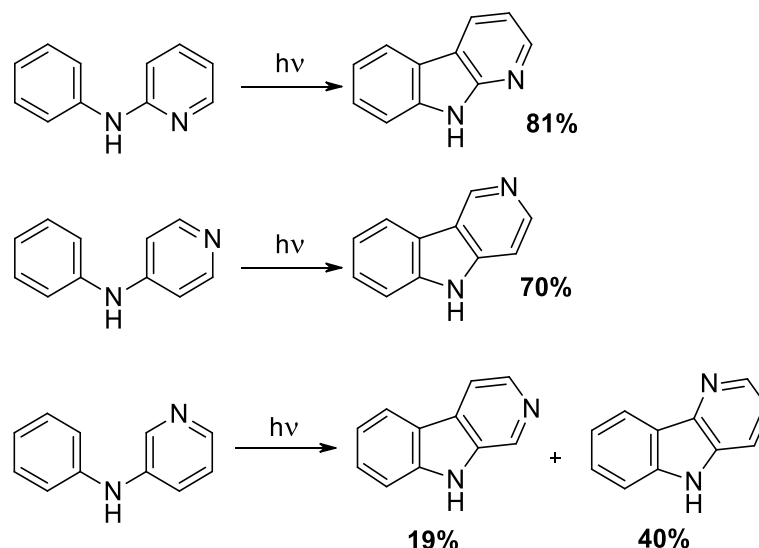


**Esquema 4.26.** Descomposición de azidas en la síntesis de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -carbolinas.

<sup>261</sup> Smith, P. A. S.; Boyer, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 2626 – 2629.

#### 4.3.1.2.2. Ciclación fotoquímica de anilino piridinas

El grupo de Herbert<sup>262</sup> describió una estrategia basada en la ciclación fotoquímica de anilino piridinas. Las carbolinas  $\alpha$ - y  $\gamma$ - se obtuvieron con buenos rendimientos por irradiación de las anilino piridinas correspondientes. La ciclación de 3-anilino piridina dió lugar a una mezcla de las  $\beta$ - y  $\delta$ -carbolinas.



**Esquema 4.27.** Síntesis de carbolinas mediante ciclación fotoquímica de anilino piridinas.

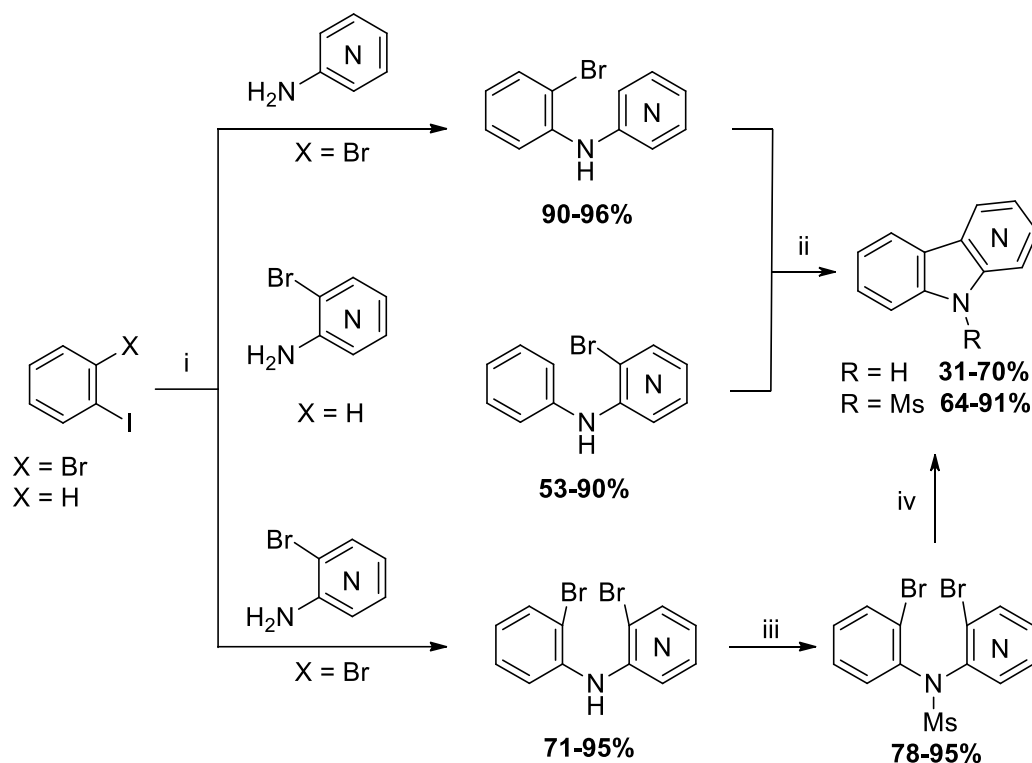
#### 4.3.1.2.3. Reacciones de acoplamiento C-C y C-N catalizadas por metales

Iwaki *et al.*<sup>263</sup> desarrollaron una metodología basada en la *C*- y *N*-arilación de piridinas catalizada por paladio, que aplicaron a la síntesis de las distintas carbolinas. Mediante acoplamientos C–N catalizado por Pd, se obtuvieron las anilino piridinas, cuyo acoplamiento C–C catalizado por Pd condujo a la obtención de las carbolinas correspondientes.

<sup>262</sup> Clark, V. M.; Cox, A.; Herbert, E. J. *J. Chem. Soc. (Org.)* **1968**, 831 – 833.

<sup>263</sup> Iwaki, T.; Yasuhara, A.; Sakamoto, T. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1999**, 1505 – 1510.

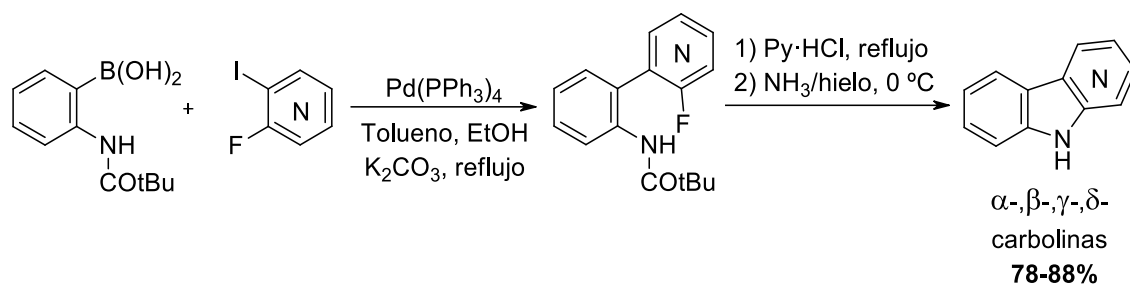




**Esquema 4.28.** Síntesis de carbolinas mediante reacciones de acoplamiento catalizadas por Pd. Condiciones de reacción: (i)  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ , 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno o  $\text{NaOtBu}$ , Tolueno, 100 °C; (ii)  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , DMF, reflujo; (iii)  $\text{NaH}$ ,  $\text{MsCl}$ , THF; (iv)  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ ,  $(\text{SnBu}_3)_2$ ,  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Et}_4\text{N}^+\text{I}^-$ , Tolueno o DMF.

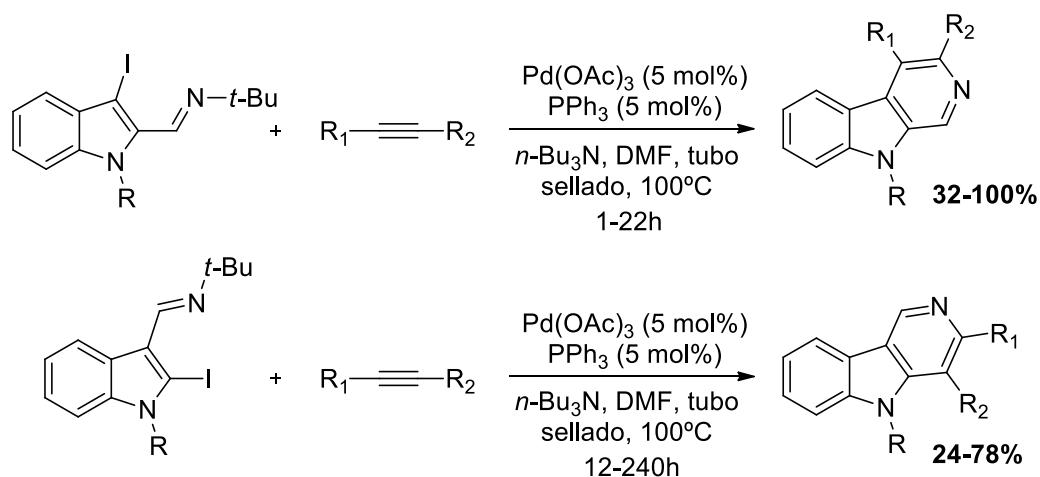
También cabe destacar la reacción de metalación descrita por Rocca *et al.*<sup>264</sup> en la que se hacen reaccionar ácidos fenilborónicos con dihalopiridinas para formar las arilpiridinas, cuya ciclación proporciona las carbolinas correspondientes con buenos rendimientos.

<sup>264</sup> (a) Rocca, P.; Marsais, F.; Godard, A.; Queguiner, G. *Tetrahedron* **1993**, 49, 49 – 64. (b) Rocca, P.; Cochenne, C.; Marsais, F.; Thomas-dit-Dumont, L.; Mallet, M.; Godard, A.; Queguiner, G. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 7832 – 7838.



**Esquema 4.29.** Síntesis de carbolinas mediante reacciones de acoplamiento C–N catalizadas por paladio.

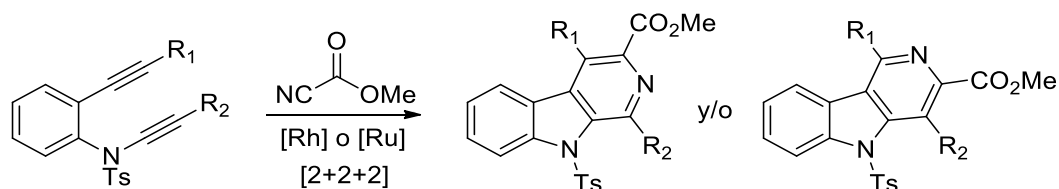
El grupo de Larock<sup>265</sup> desarrolló una estrategia basada en la iminoanulación de alquinos catalizada por paladio. Partiendo de los correspondientes indoles con un grupo imino en posición C2 y un iodo en C3, o viceversa, y distintos alquinos, se sintetizaron las correspondientes β- y γ-carbolinas.



**Esquema 4.30.** Síntesis de β- y γ-carbolinas mediante iminoanulación de alquinos catalizada por paladio.

<sup>265</sup> Zhang, H.; Larock, R. C. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 9318 – 9330.

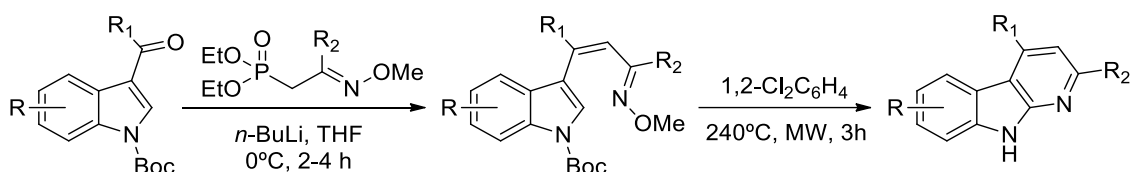
Nissen *et al.*<sup>266</sup> describieron en 2011 una aproximación a la síntesis de  $\beta$ - y  $\gamma$ -carbolinas basada en reacciones de cicloadición [2+2+2] catalizadas por Ru y Rh y aplicaron esta estrategia a la síntesis del producto natural Eudistomina U.



**Esquema 4.31.** Síntesis de  $\beta$ - y  $\gamma$ -carbolinas mediante reacciones de cicloadición [2+2+2] catalizadas por Ru y Rh.

#### 4.3.1.2.4. Otras estrategias recientes de síntesis de carbolinas

El grupo de Moody<sup>267</sup> describió en 2013 una síntesis de  $\alpha$ -carbolinas a partir de indoles, mediante la olefinación de un grupo carbonilo en posición C3 del indol para dar los correspondientes *o*-metil éteres de alquenil oximas que, tras irradiación en MW a 240 °C, y mediante una electrociclación  $6\pi$ , dan lugar a las correspondientes  $\alpha$ -carbolinas con rendimientos entre 30-90%.



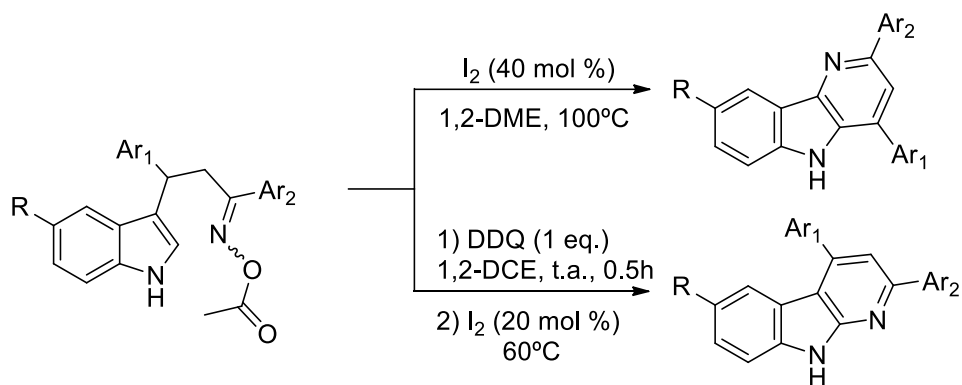
**Esquema 4.32.** Síntesis de  $\alpha$ -carbolinas mediante electrociclación  $6\pi$ .

Por último, Yang *et al.*<sup>268</sup> han publicado recientemente una estrategia para la síntesis de  $\alpha$ - y  $\delta$ -carbolinas a partir de un éster de oxima como precursor. La reacción involucra condiciones suaves de reacción, no requiere de un catalizador metálico y es regiodivergente, utilizando DDQ como agente modulador de selectividad.

<sup>266</sup> Nissen, F.; Richard, V.; Alayracab, C.; Witulski, B. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 6656 – 6658.

<sup>267</sup> Markey, S. J.; Lewis, W.; Moody, C. J. *Org. Lett.* **2013**, 15, 6306 – 6308.

<sup>268</sup> Yang, T.-H.; Kuo, C.-W.; Kavala, V.; Konala, A.; Huang, C.-Y.; Yao, C.-F. *Chem. Commun.* **2017**, 53, 1676 – 1679.

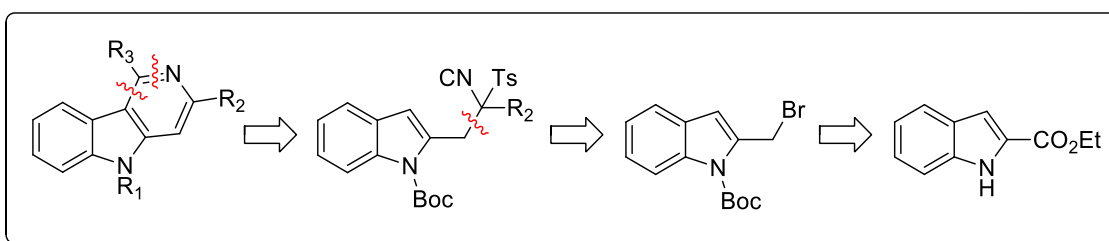


**Esquema 4.33.** Síntesis regioselectiva de  $\alpha$ - y  $\delta$ -carbolidinas.

### 4.3.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como continuación al trabajo realizado en la síntesis de isoquinolinas a partir de  $\alpha$ -arilmetil derivados de TosMIC, nos propusimos aplicar la misma estrategia a la síntesis de  $\gamma$ -carbolinas, utilizando en este caso derivados de  $\alpha$ -(2-indolilmetil) TosMIC. La naturaleza  $\pi$ -excedente del indol se preveía adecuada para que la heterociclación descrita en el apartado anterior pudiera producirse también sobre este heterociclo.

El esquema retrosintético propuesto para la síntesis de  $\gamma$ -carbolinas se muestra a continuación.



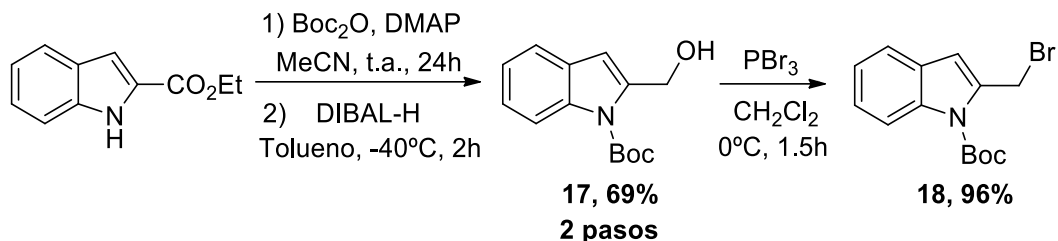
**Esquema 4.34.** Esquema retrosintético para la síntesis de  $\gamma$ -carbolinas.

Las  $\gamma$ -carbolinas se obtendrían a partir de derivados de  $\alpha$ -(2-indolilmetil) TosMIC, sintetizados a su vez mediante una reacción entre bromuro de *N*-*t*-butoxicarbonil-2-metilindol, TosMIC y un segundo haluro de alquilo en condiciones de transferencia de fase (PTC). Al no estar disponible comercialmente, el bromuro de *N*-*t*-butoxicarbonil-2-metilindol se prepararía a partir de indol-2-carboxilato de etilo.

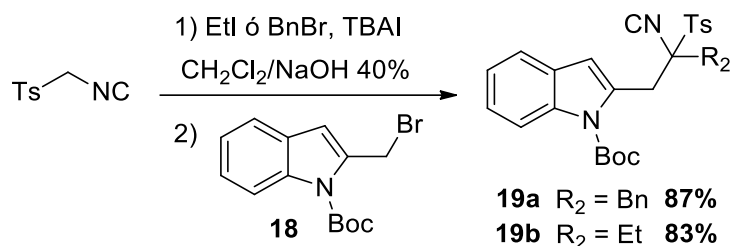
#### 4.3.2.1. Síntesis de los derivados de $\alpha$ -(2-indolilmetil) TosMIC

En primer lugar, se sintetizó el bromuro de *N*-*t*-butoxicarbonil-2-metilindol a partir del indol-2-carboxilato de etilo, para lo cual fueron necesarios 3 pasos: protección con el grupo Boc, reducción del éster a alcohol mediante tratamiento con DIBAL-H y formación del bromuro por tratamiento con tribromuro de fósforo. El bromuro de *N*-*t*-butoxicarbonil-2-metilindol<sup>269</sup> **18** obtenido es muy inestable, por lo que fue utilizado inmediatamente después de ser preparado, sin necesidad de purificación mediante cromatografía en columna.

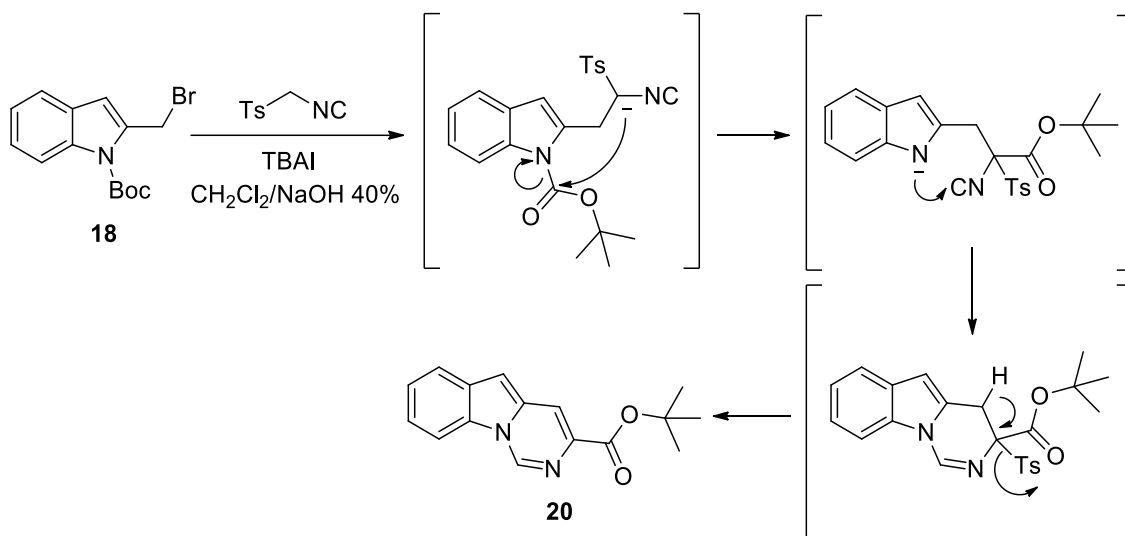
<sup>269</sup> Freed, J. D.; Hart, D. J.; Magomedov, N. A. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 839 – 852.

**Esquema 4.35.** Síntesis del *N*-*t*-butoxicarbonil-2-metilindol **18**.

A continuación, se prepararon los derivados de  $\alpha$ -(2-indolilmetil) TosMIC necesarios para la posterior ciclación. Para ello, se hizo reaccionar secuencialmente el TosMIC con dos haluros de alquilo distintos en el mismo medio bifásico [ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{NaOH}$  (40%)] en presencia de ioduro de tetrabutilamonio (TBAI). En primer lugar se adicionó el bromuro de bencilo o el ioduro de etilo y se dejó reaccionar la mezcla resultante el tiempo necesario para que la reacción se completase (2 h a 0 °C en el caso del bromuro de bencilo y 24 h a temperatura ambiente para el ioduro de etilo). Después, se adicionó el bromuro de *N*-*t*-butoxicarbonil-2-metilindol **18** a 0 °C y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 h, tras lo cual se obtuvieron los isonitrilos **19a/b** con buenos rendimientos.

**Esquema 4.36.** Síntesis de los derivados de  $\alpha$ -(2-indolilmetil) TosMIC **19a/b**.

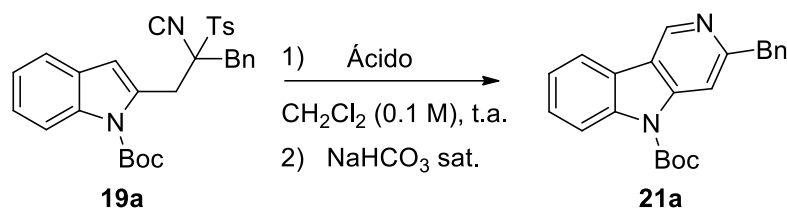
Este orden de adición de los reactivos es necesario ya que el contrario, el bromuro de *N*-*t*-butoxicarbonil-2-metilindol directamente sobre TosMIC, conduce a la indeseada formación del producto **20** mediante una transposición similar a la ya observada previamente en reacciones de naturaleza similar (**Esquema 1.1**, página 5).<sup>3</sup>

Esquema 4.37. Formación del producto **20**.

Los isonitrilos **19a/b** son bastante inestables y descomponen con facilidad, por lo que es necesario conservarlos a bajas temperaturas.

#### 4.3.2.2. Ciclaciones en condiciones ácidas

Una vez sintetizados los isonitrilos **19a/b**, se intentó la ciclación de los mismos en presencia de distintos medios ácidos. Las condiciones de reacción fueron optimizadas sobre el derivado **19a** y se ensayaron como catalizadores el ácido de Brönsted TFA y el de Lewis  $\text{AlCl}_3$ , dado que fueron los que mejores resultados mostraron en la reacción análoga de ciclación para la síntesis de isoquinolinas.<sup>8</sup> Tras la ciclación fue necesario un tratamiento básico de la mezcla de reacción (disolución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$ ) para la eliminación del ácido *p*-toluensulfónico y la consecuente aromatización del anillo piridínico.

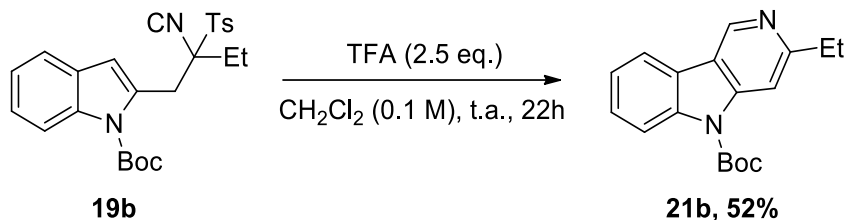
**Tabla 4.6.** Optimización de las condiciones de ciclación de **19a**.

Entrada	Ácido	Equivalentes	Tiempo	Conversión (%)	Rendimiento (%)
1	TFA	0.1	18 h	25	---
2	TFA	1.1	18 h	100	41
3	TFA	1.5	18 h	100	65
4	TFA	2.5	22 h	100	87
5	AlCl <sub>3</sub>	0.3	18 h	100	49
6	AlCl <sub>3</sub>	0.5	18 h	100	66
7	AlCl <sub>3</sub>	1	22 h	100	69

Al contrario de lo que ocurría en el caso de las isoquinolinas, no se logró conversión completa en la reacción de ciclación al utilizar ácido trifluoroacético en condiciones catalíticas (entrada 1, 0.1 equivalentes). Por ello, se aumentó la cantidad de TFA hasta proporciones estequiométricas (entradas 2-4), con lo que se observó que, mientras la adición de 1.1 equivalentes de TFA proporcionaba la carbolina **21a** con un rendimiento del 41%, este aumentaba al 65% al utilizar 1.5 equivalentes y al 87% al subir a 2.5. Por otro lado, el uso de cantidades catalíticas de AlCl<sub>3</sub> (entradas 5 y 6, 0.3 y 0.5 equivalentes) condujo a la formación de la carbolina deseada con rendimientos del 49% y 66%, respectivamente. Al aumentar el uso de este ácido de Lewis hasta proporciones estequiométricas (entrada 7, 1 equivalente) no se produjo un aumento sustancial del rendimiento. A la vista de estos resultados, se decidió realizar la ciclación



de **19b** mediante tratamiento con 2.5 equivalentes de TFA, obteniéndose la  $\gamma$ -carbolina **21b** con un rendimiento del 52%.



**Esquema 4.38.** Síntesis de la  $\gamma$ -carbolina **21b**.

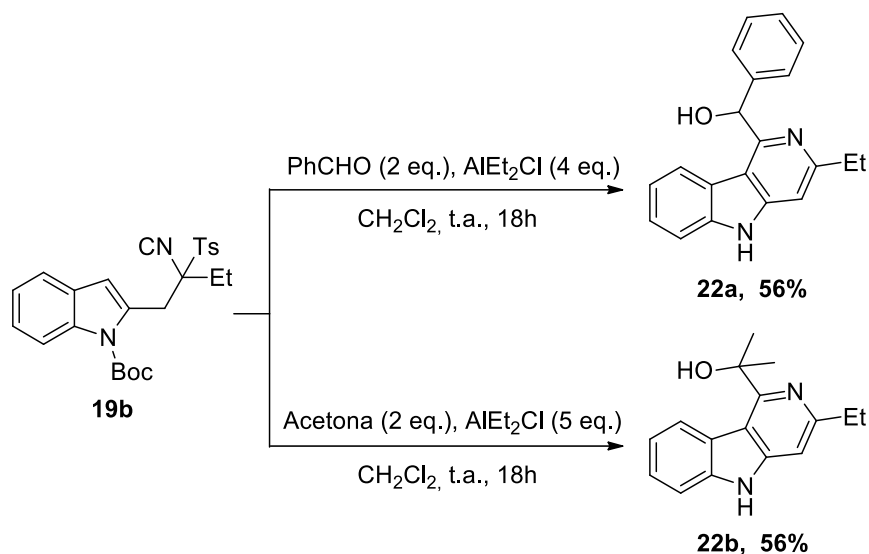
#### 4.3.2.3. Reacciones con electrófilos

Con la intención de obtener  $\gamma$ -carbolinas 1,3-disustituidas, se ensayó la ciclación de los isonitrilos **19a/b** en presencia de electrófilos diversos como aldehídos y cetonas, *N*-iodosuccinimida, epóxidos y sales de iminio. En la mayoría de los casos, se utilizó el ácido de Lewis  $\text{AlEt}_2\text{Cl}$  para favorecer la reacción, al ser el que mejores resultados produjo en la síntesis de isoquinolinas 1,3-disustituidas.<sup>270</sup>

##### 4.3.2.3.1. Reacciones con aldehídos y cetonas

Para probar la viabilidad de esta ciclación con aldehídos y cetonas, se ensayó, en presencia de  $\text{AlEt}_2\text{Cl}$ , la reacción del isonitrilo **19b** con benzaldehído y acetona. Debido a la parcial desprotección del NH indólico en las condiciones de reacción, fue necesario aumentar el número de equivalentes del ácido de Lewis para obtener conversión completa. De esta forma, se obtuvieron las isoquinolinas **22a/b** con rendimientos medios.

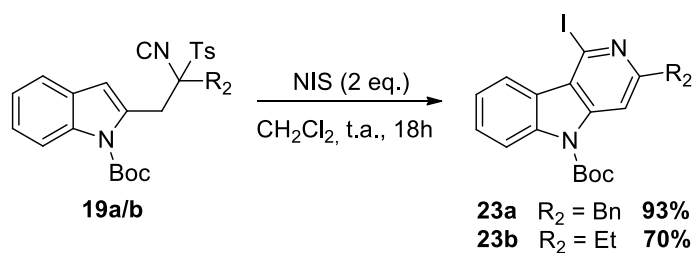
<sup>270</sup> Gutiérrez, S.; Coppola, A.; Sucunza, D.; Burgos, C.; Vaquero, J. J. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 3378 – 3381.

Esquema 4.39. Síntesis de las  $\gamma$ -carbolinas **22a/b**.

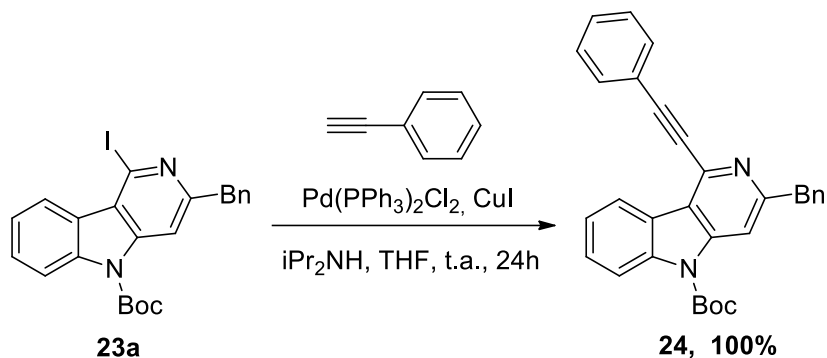
En ambos casos se obtuvo el producto desprotegido y no se observaron mezclas de éste y el producto protegido con el grupo Boc.

#### 4.3.2.3.2. Reacciones con *N*-iodosuccinimida

En las reacciones en las que se utilizó la *N*-iodosuccinimida como electrófilo no fue necesario el uso de  $\text{AlEt}_2\text{Cl}$  para favorecer la heterociclación. Las  $\gamma$ -carbolinas iodadas en la posición C1 **23a/b** se aislaron con buenos rendimientos. Al no llevarse a cabo la reacción en condiciones ácidas, estos productos conservan en su estructura el Boc como grupo protector.

Esquema 4.40. Síntesis de las  $\gamma$ -carbolinas **23a/b**.

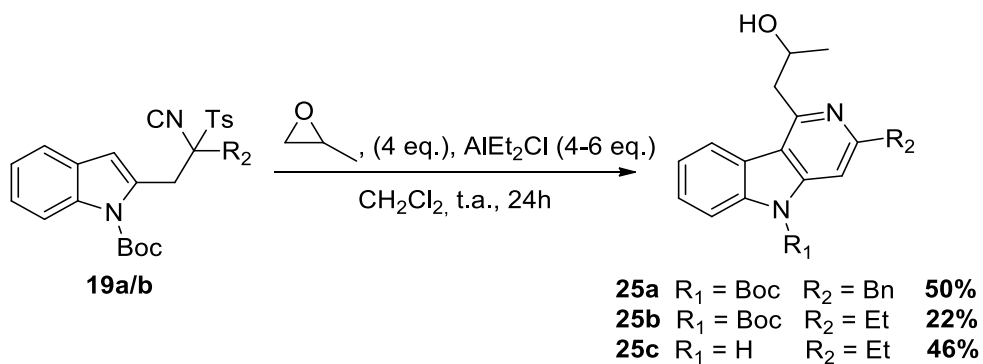
Para demostrar el potencial de estas  $\gamma$ -carbolinas con un iodo en la posición C1 de cara a proporcionar diversidad estructural a partir de las mismas, se llevó a cabo una reacción de Sonogashira sobre **23a**, obteniéndose de forma cuantitativa el producto de acoplamiento **24**.



**Esquema 4.41.** Reacción de Sonogashira sobre el producto iodado **23a** para la obtención de la  $\gamma$ -carbolina **24**.

#### 4.3.2.3.3. Reacciones con óxido de propileno

También se llevaron a cabo reacciones utilizando un epóxido como electrófilo. Se utilizó para ello el óxido de propileno.



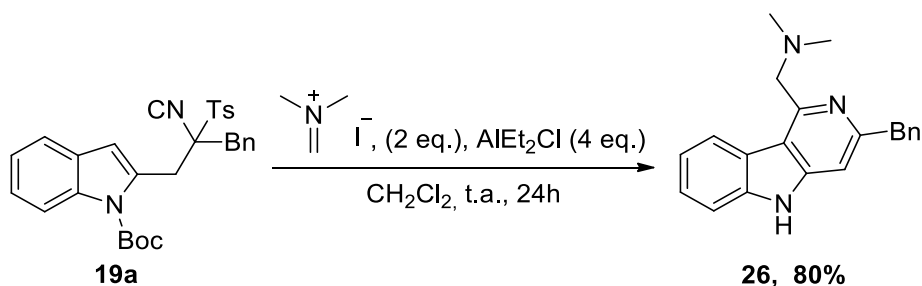
**Esquema 4.42.** Síntesis de las  $\gamma$ -carbolinas **25a-c**.

Cuando se realizó la reacción sobre el isonitrilo **19a**, la utilización de 4 equivalentes de  $\text{AlEt}_2\text{Cl}$  condujo a la obtención de la  $\gamma$ -carbolina protegida **25a** como

único producto de la reacción. Por el contrario, para el isonitrilo **19b** se utilizaron 6 equivalentes de  $\text{AlEt}_2\text{Cl}$ , obteniéndose una mezcla de carbolinas (*N*-Boc protegida y desprotegida) que se aislaron con rendimientos del 22% y 46%, respectivamente. Ambas reacciones se probaron utilizando cantidades variables del ácido de Lewis con la intención de obtener el producto desprotegido. Sin embargo, al aumentar el número de equivalentes se observó un descenso significativo de los rendimientos.

#### 4.3.2.3.4. Reacciones con la sal de Eschenmoser

Como ejemplo de sal de iminio, se utilizó el yoduro de dimetilmetilidenamonio (sal de Eschenmoser), cuya reacción con el derivado de TosMIC **19a** condujo a la obtención de la  $\gamma$ -carbolina desprotegida **26** con buen rendimiento.



Esquema 4.43. Síntesis de la  $\gamma$ -carbolina **26**.

#### 4.3.2.3.5. Reacciones con otros electrófilos

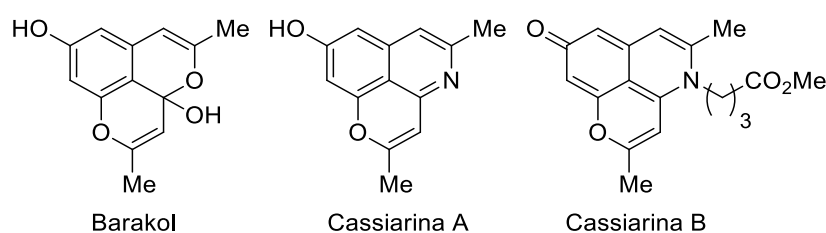
Asimismo, se ensayaron otros electrófilos en la reacción de heterociclación. En el caso de la *N*-tosilaziridina, tras 24 horas de reacción no se observó reacción del producto de partida, recuperándose el mismo inalterado. Por su parte, el uso de aceptores de Michael no ha dado por el momento resultados positivos, observándose la formación de una mezcla compleja de productos de reacción al utilizar bencilidenmalonitrilo como electrófilo.

En este apartado se ha descrito la síntesis de  $\gamma$ -carbolinas aplicando la estrategia de heterociclaciones con TosMIC desarrollada en el grupo y utilizada con éxito en la síntesis de isoquinolinas monosustituidas en C3<sup>8</sup> y 1,3-disustituidas.<sup>270</sup> Este método basado en la utilización de derivados de  $\alpha$ -(2-indolilmetil) TosMIC ha permitido la obtención de  $\gamma$ -carbolinas utilizando para la ciclación distintos ácidos y electrófilos: aldehídos, cetonas, *N*-iodosuccinimida, óxido de propileno y una sal de iminio. Además, los derivados iodados en la posición C1 posibilitan la funcionalización posterior de esta posición a través de reacciones de acoplamiento catalizadas por Pd como se ha probado mediante una reacción de Sonogashira.

## 4.4. PARTE III. SÍNTESIS TOTAL DE CASSIARINA A

### 4.4.1. CASSIARINA A

La *Cassia siamea* o *Senna siamea*, común en el sudeste asiático, ha sido ampliamente utilizada como fuente de medicinas tradicionales, en particular como febrífugo y antimalárico. Uno de los componentes más abundantes en las hojas de esta planta es el Barakol, que fue extraído por primera vez de sus hojas y flores. En 2007, Morita *et al.* descubrieron dos nuevos alcaloides<sup>271</sup> en la *Cassia siamea* y lograron aislarlos e identificarlos. Estos dos productos naturales, a los que denominaron Cassiarinas A y B, son mucho menos abundantes que el Barakol pero han despertado el interés de químicos sintéticos<sup>272,273</sup> y farmacólogos<sup>274,275</sup> debido a su potente actividad antimalárica contra *Plasmodium falciparum*, siendo más activa la Cassiarina A ( $IC_{50} = 0.005 \mu\text{g/mL}$ ).<sup>271</sup>



**Figura 4.14.** A la izquierda, estructura de tres alcaloides aislados de la *Cassia Siamea*: el Barakol y las Cassiarinas A y B. A la derecha, *Cassia siamea*.

Debido a su potente actividad antimalárica, diversos grupos de investigación han buscado la obtención de este alcaloide utilizando para ello distintas estrategias sintéticas que se describen a continuación.

<sup>271</sup> Morita, H.; Oshimi, S.; Hirasawa, Y.; Koyama, K.; Honda, T.; Eka-sari, W.; Indrayanto, G.; Zaini, N. *C. Org. Lett.* **2007**, *9*, 3691 – 3693.

<sup>272</sup> Rudyanto, M.; Tornizawa, Y.; Morita, H.; Honda, T. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1921 – 1922.

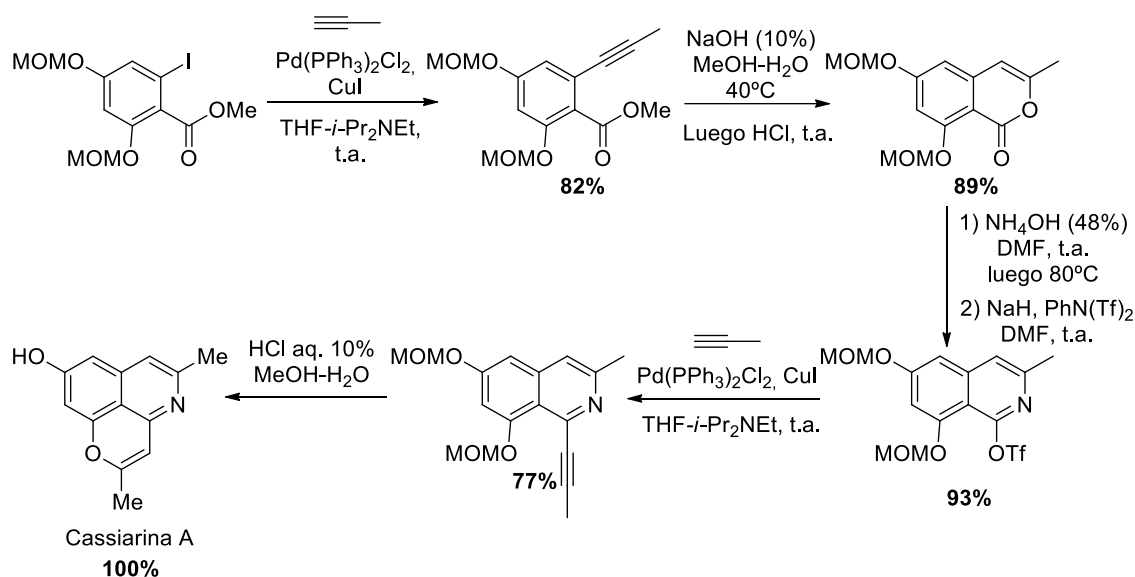
<sup>273</sup> Yao, Y. S.; Yao, Z. J. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5221 – 5225.

<sup>274</sup> Luesakul, U.; Palaga, T.; Krusong, K.; Ngamrojanavanich, N.; Vilaivan, T.; Puthong, S.; Muangsin, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 2845 – 2850.

<sup>275</sup> Matsumoto, T.; Kobayashi, T.; Ishida, K.; Hirasawa, Y.; Morita, H.; Honda, T.; Kamata, K. *Biol. Pharm. Bull.* **2010**, *33*, 844 – 848.

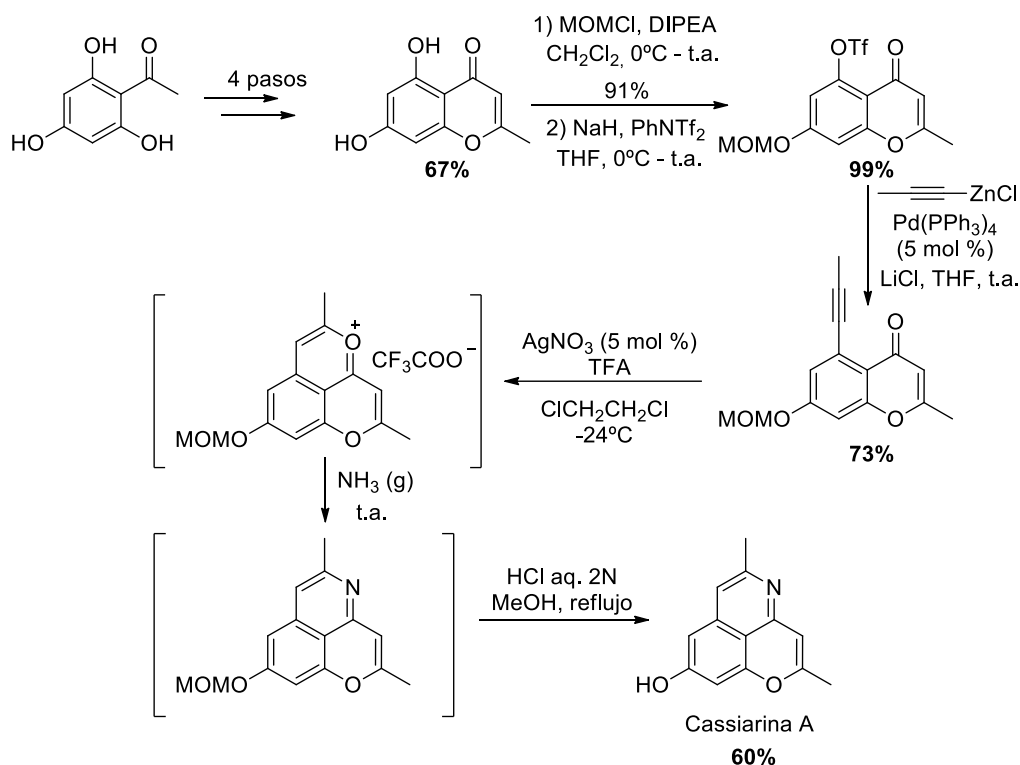
## 4.4.2. SÍNTESIS TOTALES DE CASSIARINA A

La primera síntesis total de Cassiarina A fue llevada a cabo por Rudyanto *et al.*<sup>272</sup> en 2008. Tiene como pasos clave dos acoplamientos de Sonogashira para la introducción de un alquino en el anillo aromático y dos ciclaciones 6-*endo*-dig sobre los correspondientes alquinos. De este modo, se obtuvo la Cassiarina A en 6 pasos con un rendimiento global del 52% desde un producto de partida fácilmente accesible a partir del 2,4-dihidroxibenzoato de metilo.



**Esquema 4.44.** Primera síntesis total de Cassiarina A.

Ese mismo año, Yao *et al.*<sup>273</sup> llevaron a cabo otra síntesis total de Cassiarina A utilizando una aproximación biomimética que tiene como pasos claves un acoplamiento de tipo Negishi, una formación del tricyclo promovida por  $\text{Ag(I)}$ , y una aminocondensación y ciclación secuencial. De este modo lograron sintetizar la Cassiarina A en 9 pasos a partir de la 2,4,6-trihidroxiacetofenona comercial, con un rendimiento global del 26%.



**Esquema 4.45.** Síntesis total de Cassiarina A utilizando una aproximación biomimética.

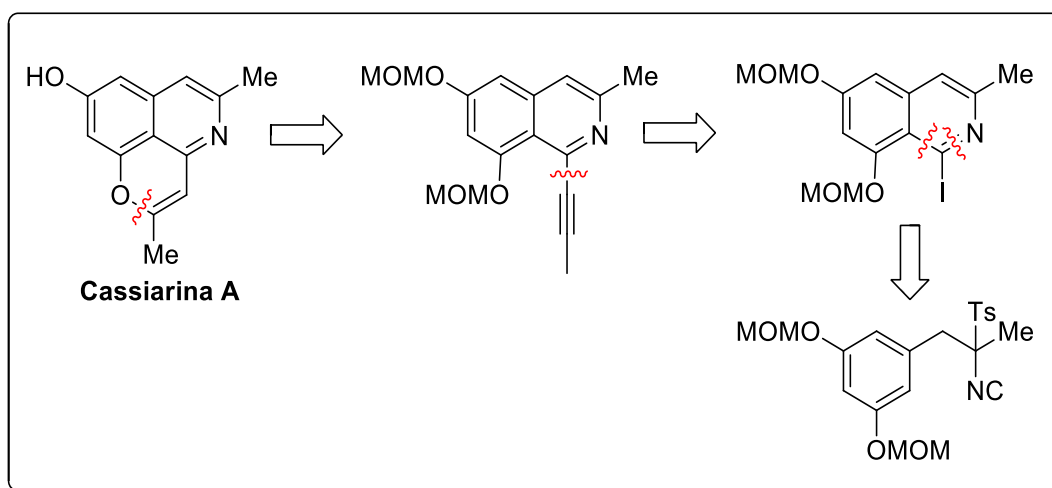
Posteriormente fueron descritas otras síntesis totales o semisíntesis de este alcaloide, como la semisíntesis propuesta por Kanputhorn *et al.*<sup>276</sup> a partir de Barakol, que otros grupos han utilizado para generar series de análogos de Cassiarina A con vistas a distintos estudios farmacológicos.<sup>274</sup> No obstante, la síntesis más eficiente hasta la fecha es la realizada por Rudyanto *et al.*<sup>272</sup>

<sup>276</sup> Kanputhorn, S.; Petsom, A.; Thamyonkit, P. *Tetrahedron* **2010**, 66, 7539 – 7543.



#### 4.4.3. SÍNTESIS TOTAL DE CASSIARINA A

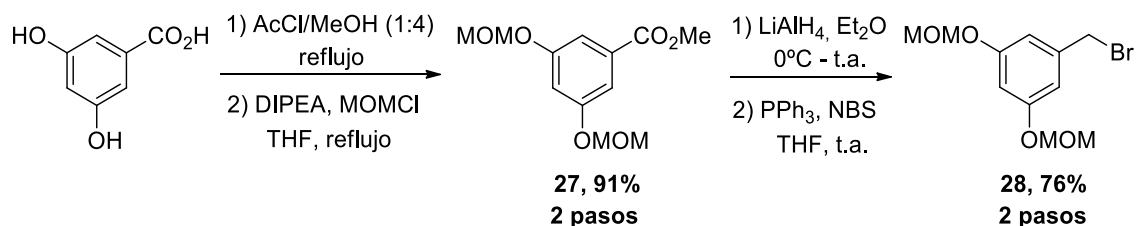
Con el objetivo de probar la aplicabilidad de nuestra metodología de heterociclaciones de derivados de  $\alpha$ -arimetil TosMIC para la síntesis de isoquinolinas 1,3-disustituidas, se abordó una nueva síntesis total de la Cassiarina A. El **Esquema 4.46** muestra la retrosíntesis propuesta. El paso clave es la formación de una 1-iodoisoquinolina, que puede ser transformada posteriormente en el alcaloide deseado tras una reacción de Sonogashira seguida de la desprotección de los grupos hidroxilo y la subsecuente ciclación 6-*endo*-dig del átomo de oxígeno sobre el alquino formado. Estos dos últimos pasos sintéticos están inspirados en la síntesis total descrita por Rudyanto *et al.*<sup>272</sup>



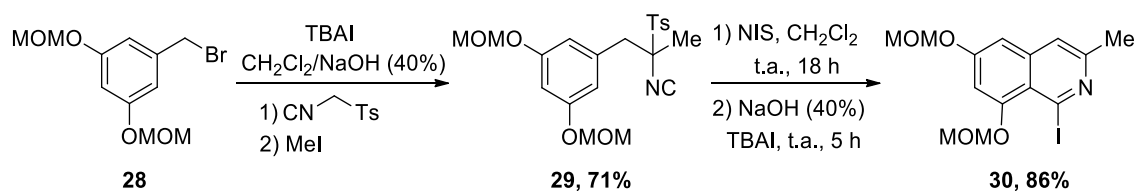
**Esquema 4.46.** Esquema retrosintético para la síntesis de Cassiarina A.

La síntesis comenzó con la preparación del bromuro de bencilo **28** a partir del ácido 3,5-dihidroxibenzoico,<sup>277</sup> para lo cual se realizaron los siguientes pasos: formación del éster metílico, protección de ambos grupos hidroxilo con MOM, reducción del éster a alcohol y transformación del alcohol en bromuro por tratamiento del mismo con NBS y trifenilfosfina.

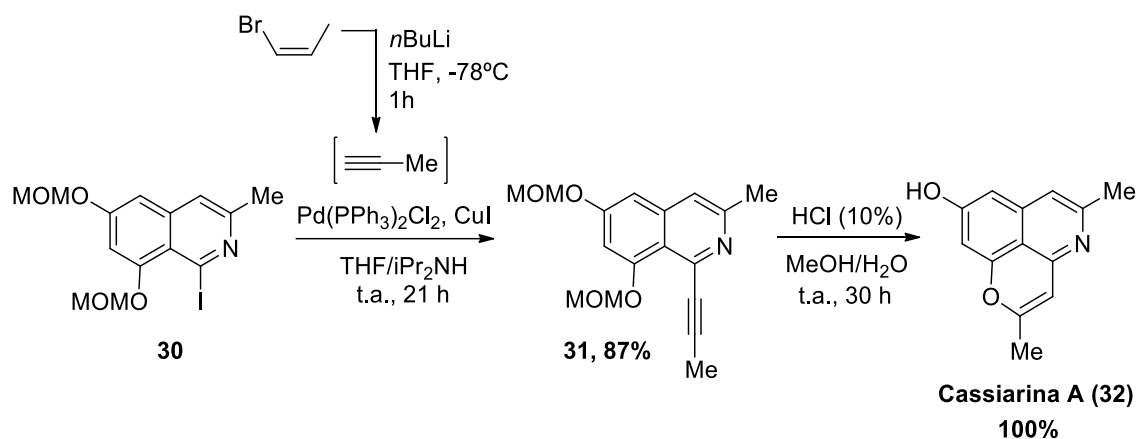
<sup>277</sup> Gester, S.; Pietzsch, J.; Wuest, F. R. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2007**, 50, 105 – 113.

**Esquema 4.47.** Síntesis del bromuro de bencilo **28**.

A continuación, se obtuvo el derivado de  $\alpha$ -arilmetil TosMIC **29** a partir del bromuro de bencilo **28** mediante una reacción de transferencia de fase (PTC) catalizada por TBAI. Así, la adición secuencial a TosMIC de **28** e ioduro de metilo en un medio bifásico [ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{NaOH}$  (40%)] dio lugar al isonitrilo **29** con un rendimiento del 71%. Posteriormente, este compuesto fue tratado con 2 equivalentes de NIS para lograr la ciclación con incorporación del yodo en el C1 de la isoquinolina y una disolución acuosa fuertemente básica [ $\text{NaOH}$  (40%)] para forzar la aromatización, con la consecuente formación de la 1-iodoisoquinolina **30** con un rendimiento del 86%.

**Esquema 4.48.** Síntesis de la 1-iodoisoquinolina **30**.

Finalmente, la reacción de Sonogashira entre la 1-iodoisoquinolina **30** y propino generado *in situ* dio lugar a la formación con un rendimiento del 87% del alquino **31**, el cual por tratamiento con una disolución acuosa al 10% de HCl en metanol condujo de forma cuantitativa al producto natural Cassiarina A.<sup>272</sup>

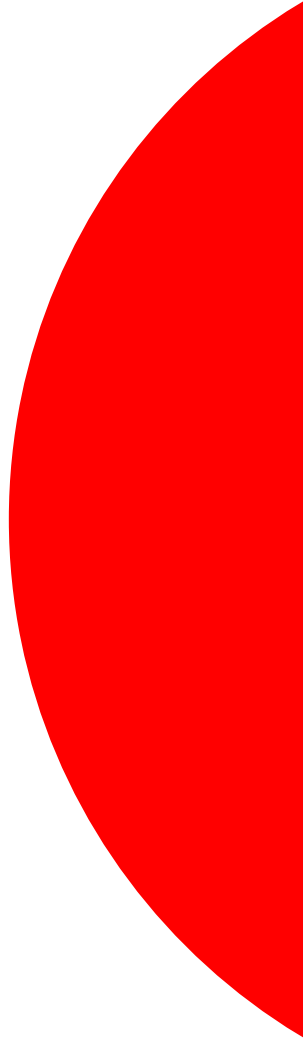


Esquema 4.49. Síntesis de Cassiarina A.

De este modo, aplicando la metodología de heterociclación previamente desarrollada en esta tesis, se ha llevado a cabo la síntesis total del alcaloide Cassiarina A en 4 pasos a partir del reactivo comercial TosMIC, con un rendimiento global del 53%,<sup>270</sup> el mejor obtenido para este alcaloide hasta la fecha aunque muy similar al descrito por Rudyanto *et al.* (53% vs 52%).



## **5. Experimental procedures**



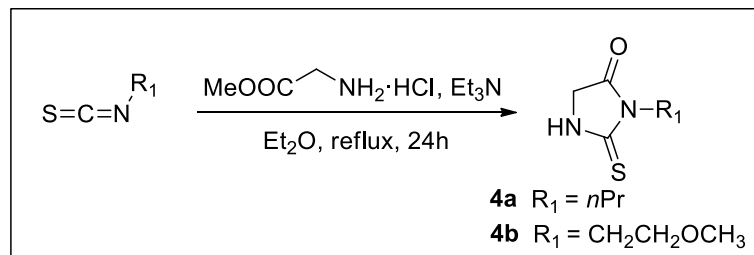


## General Information

Unless otherwise stated, all reactions were performed under an argon atmosphere, and reagents were purchased at the highest commercial quality and used without further purification. Solvent and solution additions in anhydrous atmosphere were performed using a syringe. Reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) carried out on 0.25 mm E. Merck silica gel plates (60FS-254) using UV light for visualization. Column chromatography was performed using silica gel (60 F254, 70–200 mm) as the stationary phase. The eluent used is indicated in each case and the proportions are indicated volume/volume. All melting points were determined in open capillary tubes on a Stuart Scientific SMP3 melting point apparatus. IR spectra were obtained on a Perkin-Elmer FTIR spectrum 2000 spectrophotometer.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra were recorded on either a Varian Gemini 200, Varian Mercury VX-300, Varian Unity 300 or Varian UNITYPlus 500 spectrometer at room temperature. The samples were solved using deuterated  $\text{CDCl}_3$ , acetone- $d_6$ , DMSO- $d_6$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  and  $\text{D}_2\text{O}$  from SDS. The residual solvent protons ( $^1\text{H}$ ) or the solvent carbons ( $^{13}\text{C}$ ) were used as internal standards. Chemical shifts are given in ppm ( $\delta$ ) downfield from TMS. Coupling constants ( $J$ ) are in Hertz (Hz) and signals are described as follows: s, singlet; d, doublet; t, triplet; br, broad; m, multiplet; ap, apparent. High resolution mass spectra of polar compounds (HRMS) were performed on an Agilent 6210 time-of-flight LC/MS.

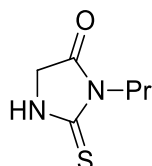
## Experimental details and characterization data for compounds of Chapter 2. GFP-chromophore analogues.

### General procedure for the preparation of thiohydantoins **4a** and **4b**



To a stirred solution of methyl glycinate hydrochloride (125 mg, 1 mmol) in anhydrous diethyl ether (3 mL), triethylamine (102 mg, 0.14 mL, 1 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 30 minutes. Then, the corresponding isothiocyanate (1 mmol) was added and the reaction mixture was heated at reflux for 24 hours with vigorous magnetic stirring. The reaction mixture was allowed to cool down to room temperature, washed with brine and the aqueous layers were extracted with diethyl ether. The combined organic layer was dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography to give the corresponding thiohydantoin.

### 3-Propyl-2-thioxoimidazolin-4-one (**4a**)

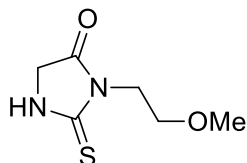


The general procedure, starting from *n*-propyl-isothiocyanate (101 mg, 0.10 mL, 1 mmol) and without further purification of the elaborated residue, yielded compound **4a** as red needles (156 mg, 0.99 mmol, 99%). Mp.: 103–104 °C. IR (KBr),  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3226, 2954, 1709, 1515, 1347, 1128, 694.  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.82 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.51–1.64 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.63 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H,



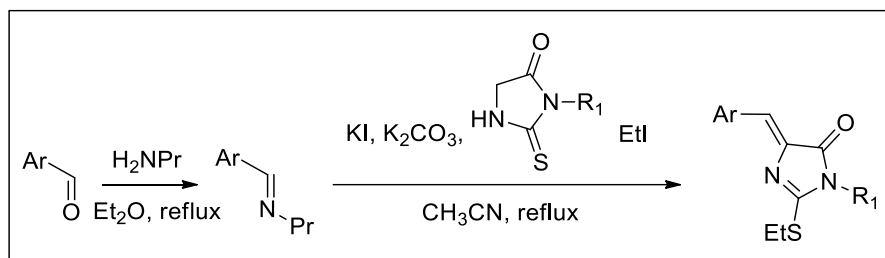
CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.03 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 8.45 (br s, 1H, NH). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 11.1, 20.8, 42.6, 48.6, 172.1, 184.8. MS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>: 159.1. Anal. Calcd. for C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>OS: C, 45.55; H, 6.37; N, 17.71; S, 20.27. Found: C, 45.11; H, 6.73; N, 17.60; S, 20.88.

### 3-(2-Methoxyethyl)-2-thioxoimidazolin-4-one (**4b**)



The general procedure, starting from 2-methoxyethylisothiocyanate (117 mg, 0.11 mL, 1 mmol), afforded a crude product which was purified by silica gel column chromatography (1:1 EtOAc/hexane) to give compound **4b** as brown needles (99 mg, 0.57 mmol, 57%). Mp.: 83–85 °C. IR (KBr),  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3235, 2924, 1724, 1509, 1342, 1174, 1091. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 3.30 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.62 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.96 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.07 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 8.16 (br s, 1H, NH). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 40.4, 48.7, 58.8, 68.8, 172.1, 184.7. MS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>: 175.1. Anal. Calcd. for C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S: C, 41.36; H, 5.79; N, 16.08; S, 18.40. Found: C, 41.85; H, 5.87; N, 15.61; S, 17.95.

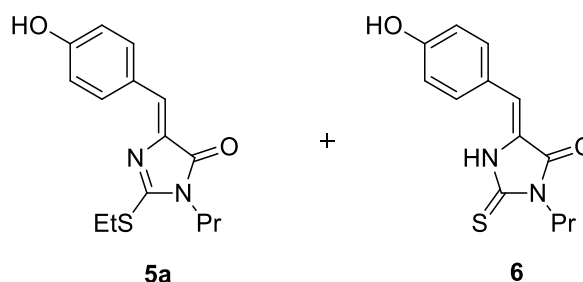
### General procedure for the preparation of imidazolones **5a-d**, **5g** (Method A)



*N*-Propylamine (59 mg, 0.08 mL, 1 mmol) was slowly added to a mixture of the corresponding 2-carboxaldehyde heterocycle (1 mmol) and anhydrous sodium sulfate

(400 mg) in diethyl ether (5 mL), and the reaction was stirred at room temperature for 4 h. The crude was then filtered off and the solvent removed under vacuum, obtaining the corresponding aldimine which was used as such without further purification. A solution of this aldimine (1 mmol) in acetonitrile (6 mL) was added to a stirring mixture of the corresponding thiohydantoin (1 mmol), potassium iodide (249 mg, 1.5 mmol) and potassium carbonate (138 mg, 1 mmol). Afterwards, iodoethane (234 mg, 0.12 mL, 1.5 mmol) was added and the reaction mixture was stirred vigorously at the appropriate reaction temperature (60–70 °C) until the starting material could not be detected by TLC. The reaction mixture was then cooled down to room temperature, washed with brine (10 mL), and the aqueous layers were extracted with ethyl acetate (15 mL). The combined organic layer was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography supplying pure compound.

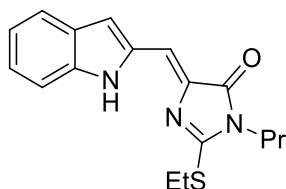
**(Z)-2-(Ethylthio)-4-(4-hydroxybenzylidene)-1-propyl-1*H*-imidazol-5(4*H*)-one (5a) + (Z)-5-(4-Hydroxybenzylidene)-3-propyl-2-thioxoimidazol-4-one (6)**



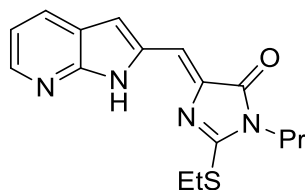
The general procedure (Method A), starting from *p*-hydroxybenzaldehyde (163 mg, 1 mmol) gave the (*E*)-4-((propylimino)methyl)phenol. The formation of the imidazolone was carried out using 3-propyl-2-thioxoimidazolin-4-one (**4a**, 158 mg, 1 mmol) and, in this case, 1 mmol of iodoethane (156 mg, 0.08 mL) was used instead of the 1.5 mmol to avoid the formation of the ethoxy-derivative. After 22 hours of reaction and purification by silica gel column chromatography (3:7 EtOAc/hexane), an inseparable mixture of **5a** and its precursor (*Z*)-5-(4-hydroxybenzylidene)-3-propyl-2-thioxoimidazol-4-one **6** (2:1) was obtained as an orange solid (253 mg). This mixture of both products was used for the next step. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>: 3322, 2930, 1683, 1592, 1357, 1272, 1155. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz Acetone-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 0.90–0.94 (m, 3H, **5a** and

**6**), 1.49 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H, **5a**), 1.63–1.75 (m, 4H, **5a** and **6**), 3.39 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2H, **5a**), 3.53 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H, **5a**), 3.81–3.84 (m, 2H, **6**), 6.61 (s, 1H, **6**), 6.77 (s, 1H, **5a**), 6.90–6.93 (m, 4H, **5a** and **6**), 7.65 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, **6**), 8.15 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, **5a**), 8.93 (s, 1H, **5a**), 8.96 (s, 1H, **6**).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz Acetone- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 11.4, 11.5, 14.8, 21.7, 22.9, 25.7, 42.8, 43.2, 113.9, 116.4, 116.5, 116.8, 116.9, 123.6, 125.3, 127.5, 132.8, 134.7, 137.4, 159.8, 160.1, 164.0, 170.0, 179.5. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for **5a**  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 291.1162. Found 291.1160.

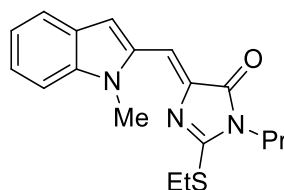
**(Z)-4-((1H-Indol-2-yl)methylene)-2-(ethylthio)-1-propyl-1H-imidazol-5(4H)-one (5b)**



The general procedure (Method A), starting from indole-2-carboxaldehyde (145 mg, 1 mmol) gave the (*E*)-*N*-((1*H*-indol-2-yl)methylene)propan-1-amine. The reaction of the imine with 3-propyl-2-thioxoimidazolin-4-one (**4a**, 158 mg, 1 mmol), after 24 hours of reaction and purification by silica gel column chromatography (1:9 EtOAc/hexane) supplied compound **5b** as a brown solid (219 mg, 0.70 mmol, 70%). Mp.: 93–95 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3328, 2930, 1718, 1607, 1490, 1342, 1209, 1118.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.01 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.62 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.72–1.79 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.36–3.43 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.59 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 6.92 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 7.12–7.17 (m, 1H), 7.28–7.33 (m, 1H), 7.41 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.68 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H) 10.69 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 11.2, 14.2, 22.2, 25.3, 42.4, 110.7, 111.3, 113.6, 120.3, 121.6, 124.7, 128.1, 134.5, 136.8, 138.4, 162.9, 168.5. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{OS}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 314.1322. Found 314.1315.

**(Z)-4-((1*H*-Pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-2-yl)methylene)-2-(ethylthio)-1-propyl-1*H*-imidazol-5(4*H*)-one (5c)**

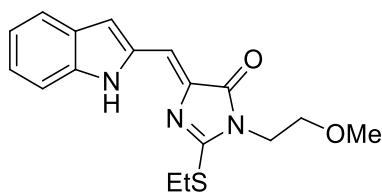
The general procedure (Method A), starting from 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-2-carbaldehyde gave the (*E*)-*N*-((1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-2-yl)methylene)butan-1-amine. The reaction of the imine with 3-propyl-2-thioxoimidazolin-4-one (**4a**, 158 mg, 1 mmol), after 24 hours of reaction and purification by silica gel column chromatography (3:7 EtOAc/hexane) gave compound **5c** as an orange oil (176 mg, 0.46 mmol, 46%). IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3485, 2966, 2932, 2043, 1718, 1628, 1593, 1487, 1331, 1212, 1105.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.94 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.53 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.61–1.75 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.36–3.44 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.54 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 6.77 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 7.04 (dd,  $J = 7.9$  Hz, 4.8 Hz, 1H), 7.89 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 8.33 (dd,  $J = 4.7, 1.5$  Hz, 1H), 10.84 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 11.3, 14.1, 22.2, 25.5, 42.6, 108.3, 112.6, 116.7, 120.8, 129.5, 134.8, 138.0, 145.6, 149.8, 164.5, 168.5. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{OS}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 315.1274. Found 315.1278.

**(Z)-2-(Ethylthio)-4-((1-methyl-1*H*-indol-2-yl)methylene)-1-propyl-1*H*-imidazol-5(4*H*)-one (5d)**

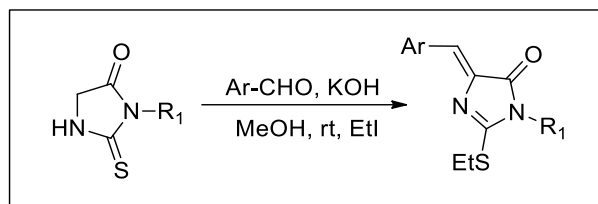
The general procedure (Method A), starting from 1-methyl-1*H*-indole-2-carboxaldehyde (159 mg, 1 mmol) gave the (*E*)-*N*-((1-methyl-1*H*-indol-2-yl)methylene)propan-1-amine. The reaction of the imine with 3-propyl-2-

thioxoimidazolin-4-one (**4a**, 158 mg, 1 mmol), after 18 hours of reaction and purification by silica gel column chromatography (2:8 EtOAc/hexane) supplied compound **5d** as a yellow solid (278 mg, 0.85 mmol, 85%). Mp.: 140–142 °C. IR (KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 2970, 1707, 1634, 1488, 1324, 1236, 1146.  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.97 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.57 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.68–1.75 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.44 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.56 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.83 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 7.05 (s, 1H), 7.10–7.13 (m, 1H), 7.25–7.31 (m, 2H), 7.67 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.82 (s, 1H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 11.3, 14.4, 22.3, 25.5, 29.8, 42.5, 109.6, 109.9, 110.7, 120.3, 121.8, 124.0, 128.4, 134.3, 138.1, 138.9, 164.3, 169.5. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{OS}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 328.1478. Found 328.1481.

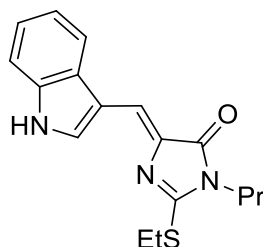
**(Z)-4-((1H-Indol-2-yl)methylene)-2-(ethylthio)-1-(2-methoxyethyl)-1H-imidazol-5(4H)-one (5g)**



The general procedure (Method A), starting from indole-2-carboxaldehyde (145 mg, 1 mmol), gave the (*E*)-*N*-((1*H*-indol-2-yl)methylene)propan-1-amine. The reaction of the imine with 3-(2-methoxyethyl)-2-thioxoimidazolin-4-one (**4b**, 174 mg, 1 mmol), after 18 hours of reaction and purification of the crude by silica gel column chromatography (1:9 EtOAc/hexane) gave compound **5g** as a brown oil (168 mg, 0.51 mmol, 51%). IR (KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3344, 2921, 1715, 1625, 1610, 1488, 1325, 1188, 1113.  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.61 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.38–3.43 (m, 5H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$  and  $\text{OCH}_3$ ), 3.63 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.82 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 6.92 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 7.14 (dd,  $J = 8.1, 7.1$  Hz, 1H), 7.30 (dd,  $J = 8.1, 7.1$  Hz, 1H), 7.39 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.67 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 10.67 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 14.2, 25.6, 40.7, 59.0, 69.6, 110.9, 111.3, 113.9, 120.3, 121.7, 124.8, 128.2, 134.5, 136.7, 138.5, 162.9, 168.5. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 330.1271. Found 330.1246.

**General procedure for the preparation of imidazolones 5e, 5f, 7b (Method B)**

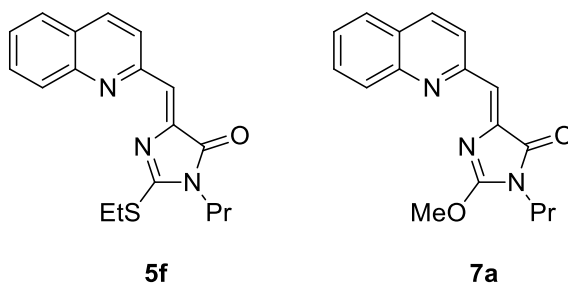
A solution of the corresponding thiohydantoin (1 mmol), the aldehyde (1 mmol) and potassium hydroxide (84 mg, 1.5 mmol) in MeOH (4 mL) was stirred at room temperature until the starting materials could not be detected by TLC. Iodoethane (234 mg, 0.12 mL, 1.5 mmol) was added, and the reaction mixture was stirred at room temperature until the reaction was completed. The crude product was washed with brine (10 mL) and the aqueous layers were extracted with ethyl acetate (15 mL). The combined organic layer was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure, and the crude product was purified by silica gel column chromatography supplying pure compound.

**(Z)-4-((1*H*-Indol-3-yl)methylene)-2-(ethylthio)-1-propyl-1*H*-imidazol-5(4*H*)-one (5e)**

Following the general procedure (Method B), starting from 3-propyl-2-thioxoimidazolin-4-one (3, 158 mg, 1 mmol) and indole-3-carboxaldehyde (145 mg, 1 mmol), the reaction mixture was stirred for 18 hours before adding iodoethane, and then for 48 hours. The crude was purified by silica gel column chromatography (3:7 EtOAc/hexane) to give compound **5e** as a yellow solid (270 mg, 0.86 mmol, 86%). Mp.: 216–218 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>: 3351, 2968, 2930, 1716, 1554, 1459, 1338, 1208, 1115. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 0.98 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.55

(t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.70–1.77 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.39 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.62 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 7.25–7.29 (m, 2H), 7.43 (s, 1H), 7.43–7.45 (dd,  $J = 5.9, 2.7$  Hz, 1H), 8.02 (dd,  $J = 5.9, 2.7$  Hz, 1H), 8.44 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 9.01 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 11.2, 14.3, 22.3, 25.1, 42.3, 111.4, 112.7, 117.2, 119.4, 121.3, 123.1, 127.2, 130.4, 135.3, 135.9, 160.6, 169.4. MS (ESI):  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 314.1. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{OS}$ : C, 65.15; H, 6.11; N, 13.41; S, 10.23. Found: C, 65.81; H, 6.19; N, 13.14; S, 11.21.

**(Z)-2-(Ethylthio)-1-propyl-4-(quinolin-2-ylmethylene)-1H-imidazol-5(4H)-one (5f)** and **(Z)-2-(Methoxy)-1-propyl-4-(quinolin-2-ylmethylene)-1H-imidazol-5(4H)-one (7a)**



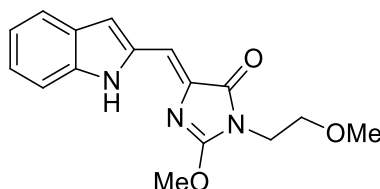
Following the general procedure (Method B), starting from 3-propyl-2-thioxoimidazolin-4-one (**3**, 158 mg, 1 mmol) and 2-quinolinecarboxaldehyde (157 mg, 1 mmol), the reaction mixture was stirred for 2 hours and then iodoethane was added. After 24 hours, the crude was purified by silica gel column chromatography (2:8 EtOAc/hexane) to give compound **5f** as an orange solid (189 mg, 0.58 mmol, 58%) and **7a** as a yellow solid (112 mg, 0.38 mmol, 38%).

**5f**: Mp.: 126–128 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 2966, 1710, 1482, 1335, 1209, 1149.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.87 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.45 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.58–1.66 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.30 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.45 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 7.18 (s, 1H), 7.40–7.45 (m, 1H), 7.58–7.63 (m, 1H), 7.68 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 8.01 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.05 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 8.82 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 10.9, 14.0, 22.0, 25.2, 42.3, 122.9, 123.4, 127.0, 127.1, 127.2, 129.3, 129.4, 135.5, 141.4, 148.1, 154.3, 167.2,

169.4. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $C_{18}H_{20}N_3OS$   $[M+H]^+$ : 326.1322. Found 326.1321.

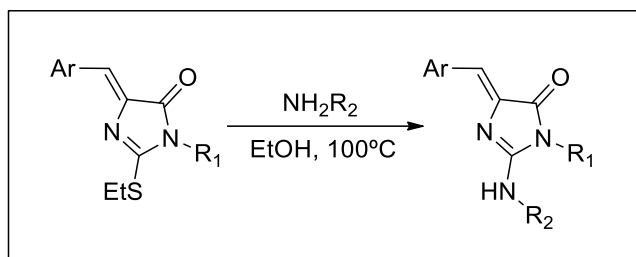
**7a**: Mp.: 157–159 °C. IR (KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 2956, 1720, 1661, 1575, 1474, 1259, 961.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.90 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.47–1.76 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.48 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 4.19 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 7.24 (s, 1H), 7.48 (ddd,  $J = 8.1$  Hz, 7.0 Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.66 (ddd,  $J = 8.4$ , 6.9, 1.4 Hz, 1H), 7.75 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 8.06 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.11 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 8.76 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 11.2, 22.0, 41.3, 56.8, 121.9, 123.5, 127.0, 127.3, 127.5, 129.5, 129.6, 135.8, 141.7, 148.4, 154.7, 164.9, 169.3. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $C_{17}H_{18}N_3O_2$   $[M+H]^+$ : 296.1394. Found 296.1393.

**(Z)-4-((1H-Indol-2-yl)methylene)-2-methoxy-1-(2-methoxyethyl)-1H-imidazol-5(4H)-one (7b)**



Following the general procedure (Method B), starting from 3-(2-methoxyethyl)-2-thioxoimidazolin-4-one (**4b**, 174 mg, 1 mmol) and indole-2-carboxaldehyde (145 mg, 1 mmol), the reaction mixture was stirred for 3 hours and then iodoethane (312 mg, 0.16 mL, 2 mmol) was added. After 24 hours, the crude was purified by silica gel column chromatography (3:7 EtOAc/hexane) to give compound **7b** as a yellow solid (174 mg, 0.58 mmol, 58%). Mp.: 121–123 °C. IR (KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3372, 2890, 1717, 1654, 1586, 1477, 1333, 1113, 959.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 3.53 (s, 3H,  $\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ), 3.75 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.90 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 4.35 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 7.00 (s, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.28–7.31 (m, 1H), 7.44 (dd,  $J = 8.2$ , 7.1 Hz, 1H), 7.57 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.81 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 10.59 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 38.9, 56.5, 58.7, 69.3, 109.4, 111.2, 112.5, 120.1, 121.3, 124.1, 128.1, 134.3, 135.8, 138.0, 161.7, 167.9. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $C_{16}H_{18}N_3O_3$   $[M+H]^+$ : 300.1343. Found 300.1342.



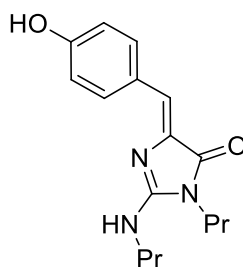


**(Z)-4-((1*H*-Indol-2-yl)methylene)-1-(2-methoxyethyl)-2-((2-methoxyethyl)amino)-1*H*-imidazol-5(4*H*)-one (2a)**

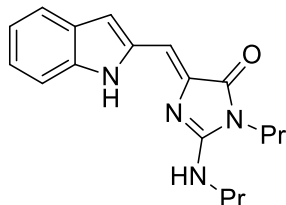
The general procedure, starting from (Z)-4-((1*H*-indol-2-yl)methylene)-2-(ethylthio)-1-(2-methoxyethyl)-1*H*-imidazol-5(4*H*)-one (**5g**, 100 mg, 0.3 mmol) and 2-methoxyethylamine (451 mg, 0.52 mL, 6 mmol), after 2 days of reaction and purification by silica gel column chromatography (1:1 EtOAc/hexane) gave compound **8** as an orange oil (55 mg, 0.16 mmol, 53%). Spectral data (NMR, IR) of this compound are identical to those of the compound previously synthesized in our group.<sup>6</sup> <sup>1</sup>H-NMR (700 MHz DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 3.26 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.34 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.48 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.61 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.72–3.76 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.78 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 6.51 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.98 (t, *J*

= 7.5 Hz, 1H), 7.10 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 7.46 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 7.51 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 7.75 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ), 11.01 (s, 1H, NH).

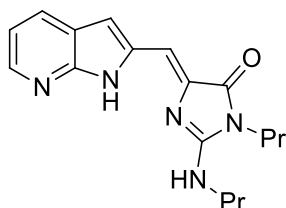
**(Z)-4-(4-Hydroxybenzylidene)-1-propyl-2-(propylamino)-1H-imidazol-5(4H)-one (2c)**



The general procedure, starting from a mixture of (Z)-2-(ethylthio)-4-(4-hydroxybenzylidene)-1-propyl-1H-imidazol-5(4H)-one (**5a**) and the intermediate (Z)-5-(4-hydroxybenzylidene)-3-propyl-2-thioxoimidazolidin-4-one (**6**) (87 mg) and *n*-propylamine (355 mg, 0.5 mL, 6 mmol), after 48 hours of reaction and purification by silica gel column chromatography (1:1 EtOAc/hexane) gave compound **2c** as a yellow solid (75 mg, 0.26 mmol, 74% in two steps from **4a**). Mp.: 182–185 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3312, 2964, 2931, 1653, 1606, 1588, 1365, 1259, 1160.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz Acetone- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 0.89 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 0.97 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.58–1.65 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.68–1.75 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.50–3.54 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.57 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 6.45 (s, 1H), 6.64 (br s, 1H, NH), 6.84 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 8.04 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 8.61 (br s, 1H, OH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz Acetone- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 11.3, 11.7, 22.8, 23.3, 40.9, 44.1, 115.0, 116.0, 129.1, 133.1, 139.1, 158.1, 158.3, 170.8. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 288.1707. Found 288.1711.

**(Z)-4-((1H-Indol-2-yl)methylene)-1-propyl-2-(propylamino)-1H-imidazol-5(4H)-one (2d)**

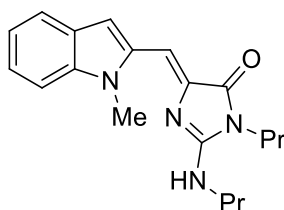
The general procedure, starting from (Z)-4-((1H-indol-2-yl)methylene)-2-(ethylthio)-1-propyl-1H-imidazol-5(4H)-one (**5b**, 94 mg, 0.3 mmol) and *n*-propylamine (355 mg, 0.5 mL, 6 mmol), after 4 days of reaction and purification by silica gel column chromatography (5:95 EtOAc/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) gave compound **2d** as a yellow solid (72 mg, 0.23 mmol, 77%). Mp.: 186–188 °C (decomposition). IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>: 3341, 2925, 1697, 1648, 1586, 1536, 1335, 1168. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 0.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.08 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.60–1.72 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.74–1.86 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.50–3.61 (m, 4H, 2 NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 5.14 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>), 6.74 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 7.07–7.12 (m, 1H), 7.20–7.25 (m, 1H), 7.41 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 10.9 (br s, 1H, NH). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 11.1, 11.4, 22.1, 22.7, 40.6, 43.8, 106.8, 107.2, 111.0, 119.7, 120.8, 123.1, 128.2, 135.6, 137.4, 137.8, 156.2, 169.1. HRMS (ESI-TOF) *m/z* calculated for C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>N<sub>4</sub>O [M+H]<sup>+</sup>: 311.1866. Found 314.1852.

**(Z)-4-((1H-Pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-2-yl)methylene)-1-propyl-2-(propylamino)-1H-imidazol-5(4H)-one (2e)**

The general procedure, starting from (Z)-4-((1H-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-2-yl)methylene)-2-(ethylthio)-1-propyl-1H-imidazol-5(4H)-one (**5c**, 94 mg, 0.3 mmol) and *n*-propylamine (355 mg, 0.5 mL, 6 mmol), after 2 days of reaction and purification

by silica gel column chromatography (1:1 EtOAc/hexane) gave compound **2e** as a yellow-orange solid (66 mg, 0.21 mmol, 71%). Mp.: 149–153 °C. IR (KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3214, 2928, 2125, 1652, 1470, 1341, 1280, 1111, 896.  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.94, (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.03 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.61–1.69 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.70–1.77 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.54 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.59–3.62 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 5.04 (br s, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ), 6.62 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 7.04 (dd,  $J = 7.8, 4.8$  Hz, 1H), 7.87 (dd,  $J = 7.8, 1.5$  Hz, 1H), 8.28 (dd,  $J = 4.8, 1.5$  Hz, 1H), 11.05 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 11.4, 11.6, 22.4, 22.9, 40.9, 43.9, 104.7, 106.4, 116.4, 121.2, 128.7, 136.3, 139.3, 144.1, 149.4, 157.0, 169.1. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 312.1819. Found 312.1822.

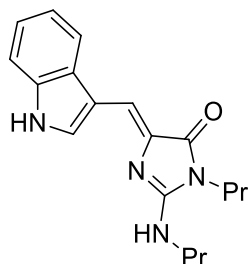
**(Z)-4-((1-Methyl-1H-indol-2-yl)methylene)-1-propyl-2-(propylamino)-1H-imidazol-5(4H)-one (2f)**



The general procedure, starting from (Z)-2-(ethylthio)-4-((1-methyl-1H-indol-2-yl)methylene)-1-propyl-1H-imidazol-5(4H)-one (**5d**, 98 mg, 0.3 mmol) and n-propylamine (355 mg, 0.5 mL, 6 mmol), after 3 days of reaction and purification by silica gel column chromatography (3:7 EtOAc/hexane) gave compound **2f** as a yellow solid (71 mg, 0.22 mmol, 73%). Mp.: 168–170 °C. IR (KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3346, 2965, 1700, 1652, 1578, 1317, 1160.  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.96 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.04 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.58–1.70 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.70–1.82 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.52 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.59–3.65 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.80 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 4.72 (br s, 1H, NH), 6.80 (s, 1H), 7.04–7.09 (m, 1H), 7.17–7.22 (m, 1H), 7.26 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.64 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.68 (s, 1H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 11.2, 11.4, 22.2, 22.8, 29.5, 40.7, 43.7, 104.1, 107.2, 109.0, 119.6, 121.1, 122.6, 128.5, 135.3, 138.1, 139.2, 157.3,

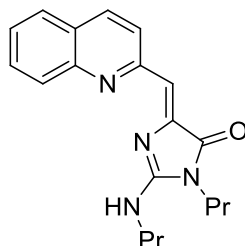
169.7. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $C_{19}H_{25}N_4O$   $[M+H]^+$ : 325.2023. Found 325.2022.

**(Z)-4-((1*H*-Indol-3-yl)methylene)-1-propyl-2-(propylamino)-1*H*-imidazol-5(4*H*)-one (2g)**



The general procedure, starting from (Z)-4-((1*H*-indol-3-yl)methylene)-2-(ethylthio)-1-propyl-1*H*-imidazol-5(4*H*)-one (**5e**, 94 mg, 0.3 mmol) and *n*-propylamine (355 mg, 0.5 mL, 6 mmol), after 8 days of reaction and purification by silica gel column chromatography (2:98 MeOH/ $CH_2Cl_2$ ) gave compound **2g** as a yellow solid (30 mg, 0.1 mmol, 32%). Mp.: 197 °C (decomposition). IR (KBr)  $\nu_{max}$   $cm^{-1}$ : 3414, 2964, 1628, 1589, 1458, 1261, 1099.  $^1H$ -NMR (300 MHz  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.00 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 3H,  $CH_2CH_2CH_3$ ), 1.06 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 3H,  $CH_2CH_2CH_3$ ), 1.62–1.85 (m, 4H, 2  $CH_2CH_2CH_3$ ), 3.54–3.63 (m, 4H, 2  $NCH_2CH_2$ ), 4.49 (br t,  $J$  = 5.4 Hz, 1H,  $NHCH_2$ ), 7.20–7.29 (m, 3H), 7.40 (dd,  $J$  = 6.4, 2.5 Hz, 1H), 7.96 (dd,  $J$  = 6.4 Hz, 2.5 Hz, 1H), 8.41 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 1H), 8.62 (br s, 1H, NH).  $^{13}C$ -NMR (125 MHz  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 11.5, 11.6, 22.5, 23.0, 40.8, 43.9, 110.5, 111.3, 113.3, 119.4, 120.7, 122.8, 127.5, 128.5, 135.9, 136.0, 155.8, 169.8. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $C_{18}H_{23}N_4O$   $[M+H]^+$ : 311.1866. Found 311.1851.

**(Z)-1-Propyl-2-(propylamino)-4-(quinolin-2-ylmethylene)-1*H*-imidazol-5(4*H*)-one (2h)**

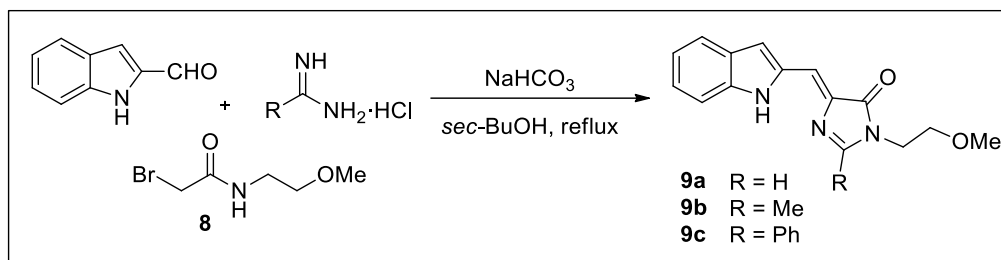


The general procedure, starting from (Z)-2-(ethylthio)-1-propyl-4-(quinolin-2-ylmethylene)-1*H*-imidazol-5(4*H*)-one (**5f**, 98 mg, 0.3 mmol) and *n*-propylamine (355 mg, 0.5 mL, 6 mmol), after 24 hours of reaction and purification by silica gel column chromatography (3:7 EtOAc/hexane) gave compound **2h** as an orange solid (76 mg, 0.23 mmol, 78%). Mp.: 112–113 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3233, 3060, 2960, 2919, 1734, 1686, 1661, 1439, 1407, 1235.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.94 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.05 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.66–1.81 (m, 4H, 2  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.40 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.66 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 6.35 (s, 1H), 7.32 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.47 (dd,  $J = 7.9, 7.1$  Hz, 1H), 7.66–7.75 (m, 2H), 7.86 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.05 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 11.18 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 11.2, 12.1, 21.3, 24.4, 40.5, 50.0, 99.6, 123.0, 126.2, 126.3, 127.7, 128.2, 130.0, 134.5, 136.3, 144.8, 147.3, 156.1, 164.1. HRMS  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 323.1866. Found 323.1862.

## Experimental details and characterization data for compounds of Chapter 3. Calpain inhibitors.

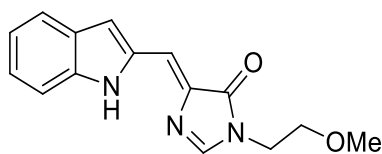
2-Bromo-*N*-(2-methoxyethyl)-acetamide (**8**) was synthesized following the procedure described in the literature<sup>171</sup> and was obtained in 86% yield.

### General procedure for the preparation of compounds **9a-c**



To a stirred solution of indole-2-carboxaldehyde (145 mg, 1 mmol), the corresponding amidine hydrochloride (1.5 mmol) and dried  $\text{NaHCO}_3$  (420 mg, 5 mmol) in anhydrous *sec*-butanol (2 mL), a solution of 2-bromo-*N*-(2-methoxyethyl)-acetamide (**8**, 470 mg, 2.4 mmol) in *sec*-butanol (1 mL) was added, and the reaction mixture was heated at reflux until indole-2-carboxaldehyde could not be detected by TLC. Then, the reaction was cooled down to room temperature, the solid was filtered off, and the solvent was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography to give the corresponding product.

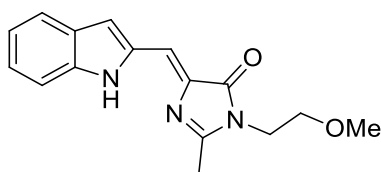
### (*Z*)-3,5-Dihydro-5-((1*H*-indol-2-yl)methylene)-3-(2-methoxyethyl)-4*H*-imidazol-4-one (**9a**)



The general procedure, starting from formamidine hydrochloride (80.5 mg, 1.5 mmol), after 3.5 hours of reaction and purification by silica gel column chromatography (1:1 EtOAc/hexane) gave compound **9a** as an orange solid (196 mg, 0.73 mmol, 73%). Mp.: 136–139 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3422, 3324, 2895, 1697, 1629, 1331, 1175, 1117.

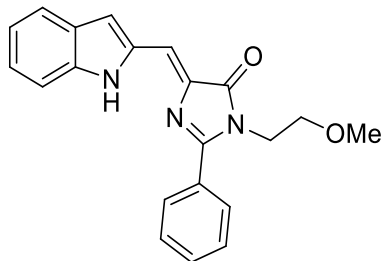
$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 3.37 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.55 (t,  $J = 4.8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.76 (t,  $J = 4.8$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 6.98 (s, 1H), 7.12 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.30 (t,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 7.42 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.65 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 10.73 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 41.2, 59.0, 70.6, 111.7, 113.0, 119.7, 120.5, 122.0, 125.6, 128.0, 134.0, 136.3, 139.2, 152.2, 168.5. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 270.1239. Found 270.1240.

**(Z)-(3,5-Dihydro-5-((1H-indol-2-yl)methylene)-3-(2-methoxyethyl)-2-methyl-4H-imidazol-4-one (9b)**

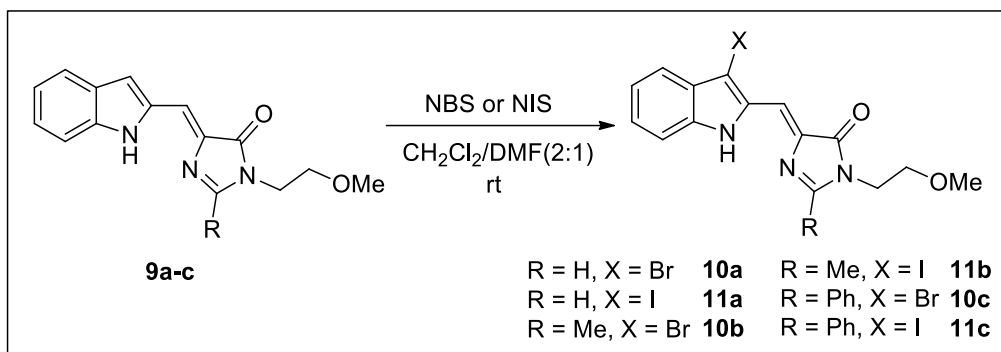


The general procedure, starting from acetamidine hydrochloride (142 mg, 1.5 mmol), after 4 hours of reaction and purification by silica gel column chromatography (1:1 EtOAc/hexane) gave compound **9b** as a yellow solid (240 mg, 0.85 mmol, 85%). Mp.: 144–146 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3369, 2914, 1705, 1635, 1408, 1328, 1111, 799.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.40 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.35 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.55 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.73 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 6.95 (s, 1H), 7.15 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.18 (s, 1H), 7.32 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.46 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.68 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 10.85 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 15.6, 40.8, 58.9, 70.4, 111.4, 111.5, 116.5, 120.2, 121.6, 124.9, 128.0, 134.3, 136.5, 138.7, 161.4, 169.2. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 284.1395. Found 284.1398.

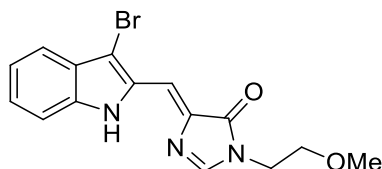


**(Z)-3,5-Dihydro-5-((1*H*-indol-2-yl)methylene)-3-(2-methoxyethyl)-2-phenyl-4*H*-imidazol-4-one (9c)**

The general procedure, starting from benzamidine hydrochloride (235 mg, 1.5 mmol), after 4 hours of reaction and purification by silica gel column chromatography (2:8 EtOAc/hexane) gave compound **9c** as an orange oil (197 mg, 0.57 mmol, 57%). Mp.: 144–146 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3353, 2926, 1702, 1634, 1446, 1344, 1114.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 3.33 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.67 (t,  $J = 5.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.98 (t,  $J = 5.4$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 7.03 (s, 1H), 7.16 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.32 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.44 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.58–7.66 (m, 3H), 7.70 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.94–8.03 (m, 2H), 10.88 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 41.8, 58.9, 69.6, 111.7, 112.5, 118.3, 120.4, 121.8, 125.3, 128.1, 128.8 (2C), 128.9 (2C), 129.5, 131.2, 134.4, 136.7, 139.1, 161.0, 170.3. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 346.1551. Found 346.1548.

General procedure for the preparation of halogenated compounds **10a-c** and **11a-c**

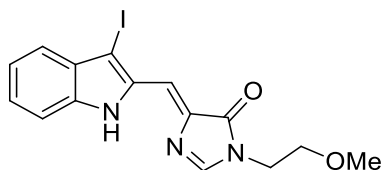
To a stirred solution of compound **9a-c** (1 mmol) in dry DMF:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 mL, 1:2), *N*-bromosuccinimide (NBS, 180 mg, 1 mmol) for the brominated compounds or *N*-iodosuccinimide (NIS, 225 mg, 1 mmol) for the iodinated ones was added, and the mixture was stirred at room temperature until the starting material could not be detected by TLC. Then, the reaction mixture was washed with brine and the aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layer was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography to give the corresponding halogenated product.

**(Z)-5-((3-Bromo-1H-indol-2-yl)methylene)-3,5-dihydro-3-(2-methoxyethyl)-4H-imidazol-4-one (10a)**

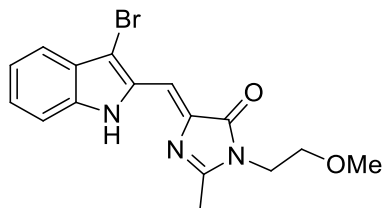
The general procedure, starting from (Z)-3,5-dihydro-5-((1H-indol-2-yl)methylene)-3-(2-methoxyethyl)-4H-imidazol-4-one (**9a**, 269 mg, 1 mmol) and NBS, after 3.5 hours of reaction and purification by silica gel column chromatography (4:6 EtOAc/hexane) gave compound **10a** as a yellow solid (324 mg, 0.93 mmol, 93%). Mp.: 168–171 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>: 3328, 2129, 1637, 1460, 1322, 1267, 1115, 896. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 3.39 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.57 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.79 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 7.18 (ddd, *J* = 7.9, 6.4, 1.5 Hz, 1H),

7.29–7.41 (m, 3H), 7.59 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.86 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H), 10.90 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 41.3, 59.0, 70.5, 102.2, 111.9, 116.4, 120.4, 121.1, 126.5, 127.3, 131.8, 137.0, 137.9, 152.9, 168.2. Anal. calculated for  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{BrN}_3\text{O}_2$ : C, 51.74; H, 4.05; N, 12.07. Found: C, 51.77; H, 4.01; N, 11.75.

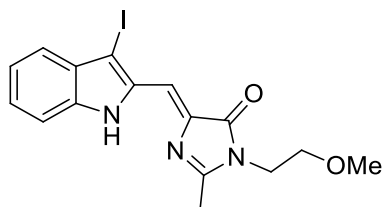
**(Z)-3,5-Dihydro-5-((3-iodo-1H-indol-2-yl)methylene)-3-(2-methoxyethyl)-4H-imidazol-4-one (11a)**



The general procedure, starting from (Z)-3,5-dihydro-5-((1H-indol-2-yl)methylene)-3-(2-methoxyethyl)-4H-imidazol-4-one (**9a**, 269 mg, 1 mmol) and NIS, after 4.5 hours of reaction and purification by silica gel column chromatography (4:6 EtOAc/hexane) gave compound **11a** as a yellow solid (375 mg, 0.95 mmol, 95%). Mp.: 155–157 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3333, 2924, 1706 1623, 1324, 1218, 1004.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 3.37 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.56 (t,  $J = 4.9$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.79 (t,  $J = 4.9$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 7.16 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.28–7.38 (m, 3H), 7.47 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.86 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 11.12 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 41.5, 59.2, 70.7, 73.0, 112.0, 118.7, 121.3, 122.5, 126.6, 131.0, 135.2, 137.5, 138.7, 152.9, 168.2. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{IN}_3\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 396.0203. Found 396.0163.

**(Z)-5-((3-Bromo-1*H*-indol-2-yl)methylene)-3,5-dihydro-3-(2-methoxyethyl)-2-methyl-4*H*-imidazol-4-one (10b)**

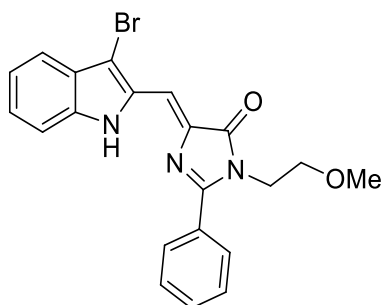
The general procedure, starting from (Z)-3,5-dihydro-5-((1*H*-indol-2-yl)methylene)-3-(2-methoxyethyl)-2-methyl-4*H*-imidazol-4-one (**9b**, 283 mg, 1 mmol) and NBS, after 4 hours of reaction and purification by silica gel column chromatography (3:7 EtOAc/hexane) gave compound **10b** as a yellow oil (282 mg, 0.78 mmol, 78%). IR (NaCl)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3321, 2922, 1711, 1638, 1409, 1337, 1105, 741.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.39 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.31 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.52 (t,  $J = 4.8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.72 (t,  $J = 4.8$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 7.15 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.28 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.37 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.55 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 10.93 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (50 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 16.0, 41.0, 59.1, 70.6, 100.6, 111.9, 113.5, 120.1, 120.9, 126.0, 127.4, 132.2, 137.4, 137.5, 162.4, 169.1. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{16}\text{H}_{17}^{79}\text{BrN}_3\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 362.0501. Found 362.0499.

**(Z)-3,5-Dihydro-5-((3-iodo-1*H*-indol-2-yl)methylene)-3-(2-methoxyethyl)-2-methyl-4*H*-imidazol-4-one (11b)**

The general procedure, starting from (Z)-3,5-dihydro-5-((1*H*-indol-2-yl)methylene)-3-(2-methoxyethyl)-2-methyl-4*H*-imidazol-4-one (**9b**, 283 mg, 1 mmol) and NIS, after 4 hours of reaction and purification by silica gel column chromatography (1:1 EtOAc/hexane) gave compound **11b** as an orange solid (297 mg, 0.97 mmol, 97%). Mp.: 146–147 °C. IR (KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3323, 2923, 1711, 1637, 1407, 1331, 1218, 1103,

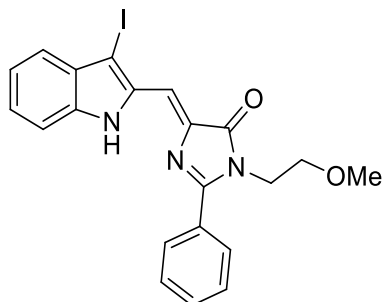
739.  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.42 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.32 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.54 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.76 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 7.15 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.37 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.45 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 11.18 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 16.1, 41.1, 59.2, 70.6, 71.1, 111.9, 115.7, 121.2, 122.3, 126.1, 131.1, 135.7, 137.9, 138.5, 162.5, 169.3. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{IN}_3\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 410.0361. Found 410.0383.

**(Z)-5-((3-Bromo-1H-indol-2-yl)methylene)-3,5-dihydro-3-(2-methoxyethyl)-2-phenyl-4H-imidazol-4-one (10c)**

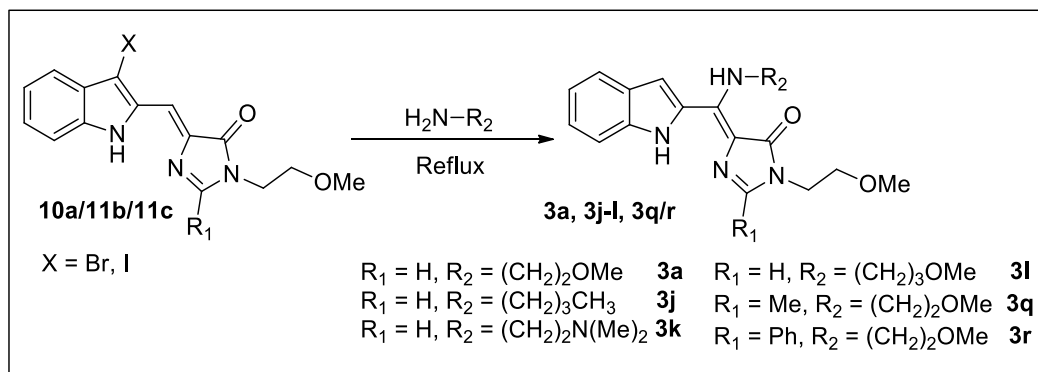


The general procedure, starting from (Z)-3,5-dihydro-5-((1H-indol-2-yl)methylene)-3-(2-methoxyethyl)-2-phenyl-4H-imidazol-4-one (**9c**, 345 mg, 1 mmol) and NBS, after 5 hours of reaction and purification by silica gel column chromatography (4:6 EtOAc/hexane) gave compound **10c** as an orange solid (326 mg, 0.77 mmol, 77%). Mp.: 155–156 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3323, 3058, 2926, 1708, 1635, 1460, 1336, 1219, 1116.  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 3.28 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.63 (t,  $J = 5.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.95 (t,  $J = 5.5$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 7.15 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.29 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.36 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.55–7.63 (m, 4H), 7.91–7.94 (m, 2H), 10.98 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 42.1, 59.1, 69.7, 101.8, 111.9, 115.2, 120.3, 121.1, 126.3, 127.5, 128.7 (2C), 128.8 (2C), 129.1, 131.2, 132.1, 137.4, 137.6, 161.7, 170.0. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{21}\text{H}_{19}^{79}\text{BrN}_3\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 424.0657. Found 424.0649.

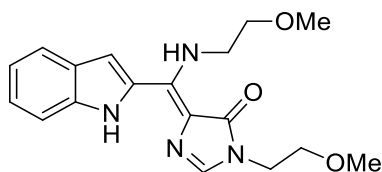
**(Z)-3,5-Dihydro-5-((3-iodo-1*H*-indol-2-yl)methylene)-3-(2-methoxyethyl)-2-phenyl-4*H*-imidazol-4-one (11c)**



The general procedure, starting from (Z)-3,5-dihydro-5-((1*H*-indol-2-yl)methylene)-3-(2-methoxyethyl)-2-phenyl-4*H*-imidazol-4-one (**9c**, 345 mg, 1 mmol) and NIS, after 4 hours of reaction and purification by silica gel column chromatography (3:7 EtOAc/hexane) gave compound **11c** as an orange solid (466 mg, 0.99 mmol, 99%). Mp.: 152–153 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3305, 2921, 1710, 1633, 1445, 1333, 1111, 732.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 3.28 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.63 (t,  $J = 5.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.96 (t,  $J = 5.5$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 7.16 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.29 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 7.35 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.37 (1 H, s), 7.47 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.55–7.63 (m, 3H), 7.92 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 11.22 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 42.2, 59.1, 69.7, 72.4, 111.8, 117.1, 121.1, 122.2, 126.2, 128.8 (2C), 128.9 (2C), 129.2, 131.0, 131.4, 135.7, 137.8, 138.6, 161.9, 170.2. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{IN}_3\text{O}_2$ : C, 53.52; H, 3.85; N, 8.92. Found: C, 53.77; H, 4.13; N, 8.57.

General procedure for the preparation of amino derivatives **3a**, **3j-l**, **3q/r**

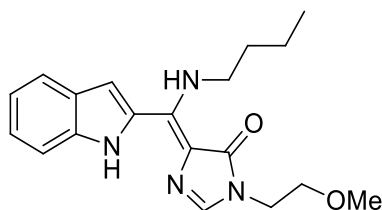
A solution of halogenated product **10a**, **11b** or **11c** (0.20 mmol) in the corresponding amine (5 mL) was stirred at reflux until the starting material could not be detected by TLC. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue thus obtained was purified by silica gel column chromatography to give the corresponding amino derivative.

**(E)-3,5-Dihydro-5-((1*H*-indol-2-yl)(2-methoxyethylamino)methylene)-3-(2-methoxyethyl)-4*H*-imidazol-4-one (**3a**)<sup>6</sup>**

The general procedure, starting from (Z)-5-((3-bromo-1*H*-indol-2-yl)methylene)-3,5-dihydro-3-(2-methoxyethyl)-4*H*-imidazol-4-one (**10a**, 70 mg, 0.20 mmol) and 2-methoxyethylamine, after 24 hours of reaction and purification by silica gel column chromatography (1:1 EtOAc/hexane) gave compound **3a** as an orange solid (50 mg, 0.15 mmol, 73%). Spectral data (NMR, IR) of this compound are identical to those of the compound previously synthesized in our group.<sup>6</sup> Mp.: 72–74 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3323, 3058, 2926, 1708, 1635, 1460, 1336, 1219, 1116. <sup>1</sup>H-NMR (700 MHz DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 3.26 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.31 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.54 (t,  $J = 5.4$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.57 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.77–3.81 (m, 4H, 2 NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 7.08 (t,  $J = 7.4$  Hz,

1H), 7.13 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 7.22–7.24 (m, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.58 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.66 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 9.74 (t,  $J = 5.4$  Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ), 11.87 (br s, 1H, NH).

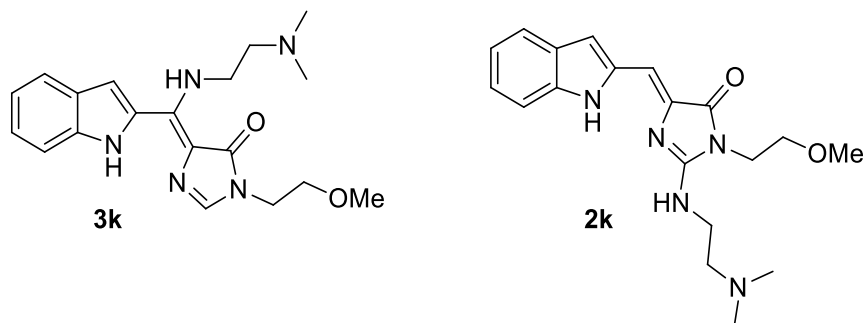
**(*E*)-5-(Butylamino-(1*H*-indol-2-yl)-methylene)-3,5-dihydro-3-(2-methoxyethyl)-4*H*-imidazol-4-one (3j)**



The general procedure, starting from (*Z*)-5-((3-bromo-1*H*-indol-2-yl)methylene)-3,5-dihydro-3-(2-methoxyethyl)-4*H*-imidazol-4-one (**10a**, 70 mg, 0.20 mmol) and *n*-butylamine, after 24 hours of reaction and purification by silica gel column chromatography (1:1 EtOAc/hexane) gave compound **3j** as an orange oil (35 mg, 0.10 mmol, 52%). IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3260, 2930, 1719, 1625, 1535, 1459, 1349, 1276, 1118, 1009.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.99 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.50–1.63 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.77–1.87 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.34 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.59 (t,  $J = 4.9$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.80 (q,  $J = 6.8$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.88 (t,  $J = 4.9$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 7.12 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.19 (br s, 1H), 7.29 (t,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.49 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.68 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 10.10 (br s, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ), 12.40 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 13.8, 20.1, 32.0, 41.0, 46.2, 59.0, 71.0, 109.9, 112.2, 113.4, 120.5, 121.8, 125.1, 127.3, 128.9, 136.2, 137.1, 148.8, 165.9. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 341.1972. Found 341.1974.



**(*E*)-3,5-Dihydro-5-((2-dimethylamino)ethylamino)-(1*H*-indol-2-yl)-methylene)-3-(2-methoxyethyl)-4*H*-imidazol-4-one (3k) and (*Z*)-4-((1*H*-indol-2-yl)methylene)-2-((2-(dimethylamino)ethyl)amino)-1-(2-methoxyethyl)-1*H*-imidazol-5(4*H*)-one (2k)**



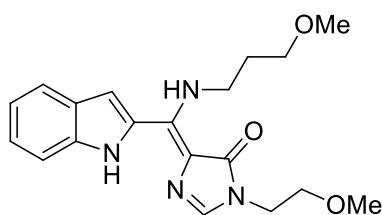
The general procedure, starting from (*Z*)-5-((3-bromo-1*H*-indol-2-yl)methylene)-3,5-dihydro-3-(2-methoxyethyl)-4*H*-imidazol-4-one (**10a**, 70 mg, 0.20 mmol) and *N,N*-dimethylethylenediamine, after 4 hours of reaction and purification by silica gel column chromatography (1:9 MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) gave compound **3k** as an orange oil (9 mg, 0.03 mmol, 13%) and compound **2k** as a yellow oil (16 mg, 0.05 mmol, 23%). When the reaction was carried out in a sealed tube, at 110 °C for 5h, compound **2k** was obtained in 73% yield (52 mg, 0.15 mmol).

**3k**: IR (NaCl)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3243, 2938, 2822, 1722, 1634, 1539, 1471, 1349, 1274, 1118. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 2.41 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.75 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.39 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.63 (t, *J* = 4.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.88–3.94 (m, 4H, 2 NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 7.16 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.28–7.38 (m, 3H), 7.52 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 10.12 (br s, 1H, NH), 12.54 (br s, 1H, NH). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 41.1, 44.5, 45.8 (2C), 59.0, 59.1, 71.3, 110.1, 112.3, 114.1, 120.6, 122.0, 125.1, 127.6, 129.0, 137.0, 137.2, 148.9, 166.2. HRMS (ESI-TOF) *m/z* calculated for C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 356.2081. Found 356.2070.

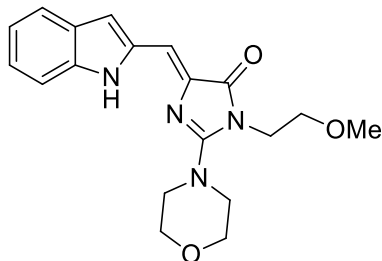
**2k**: IR (NaCl)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3298, 3060, 2925, 2853, 1717, 1649, 1589, 1456, 1336, 1216, 1117. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 2.34 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.62 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.39 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.57 (dd, *J* = 4.9, 3.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.59–3.67 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.82 (dd, *J* = 5.0, 3.8 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 6.71 (s, 1H),

6.79 (s, 1H), 6.93 (br s, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ), 7.06 (ddd,  $J = 8.0, 7.1, 1.0$  Hz, 1H), 7.19 (ddd,  $J = 8.2, 7.0, 1.2$  Hz, 1H), 7.37 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.59 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 10.83 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 39.4, 40.5, 45.3, 57.6, 59.8, 72.3, 106.9, 107.3, 111.1, 119.9, 121.0, 123.2, 128.5, 135.9, 137.6, 138.2, 157.9, 169.2. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 356.2081. Found 356.2070.

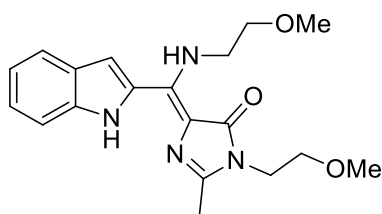
**(*E*)-3,5-Dihydro-5-(1*H*-indol-2-yl)-(3-methoxypropylamino)methylene)-3-(2-methoxyethyl)-4*H*-imidazol-4-one (3l)**



The general procedure, starting from (*Z*)-5-((3-bromo-1*H*-indol-2-yl)methylene)-3,5-dihydro-3-(2-methoxyethyl)-4*H*-imidazol-4-one (**10a**, 70 mg, 0.20 mmol) and 3-methoxypropylamine, after 24 hours of reaction and purification by silica gel column chromatography (1:1 EtOAc/hexane) gave compound **3l** as a yellow oil (48 mg, 0.13 mmol, 67%). IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3254, 2924, 1727, 1626, 1537, 1467, 1349, 1276, 1118.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.07–2.16 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.39 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.41 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.63 (t,  $J = 5.4$  Hz, 4H, 2  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.90–3.99 (m, 4H, 2  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 7.16 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.28–7.38 (m, 3H), 7.52 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.72 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 10.12 (br s, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ), 12.54 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 30.1, 41.0, 43.4, 58.8, 59.0, 69.4, 71.0, 110.1, 112.2, 113.6, 120.5, 121.8, 125.1, 127.4, 128.7, 136.4, 137.1, 148.9, 166.0. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 357.1921. Found 357.1913.

**(Z)-4-((1H-Indol-2-yl)methylene)-1-(2-methoxyethyl)-2-morpholino-1H-imidazol-5(4H)-one (2m)**

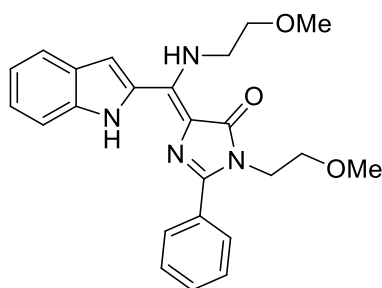
A solution of halogenated product **10a** (50 mg, 0.14 mmol) in morpholine (2 mL) was irradiated by microwave, heating at 50 °C for 1 minute. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue thus obtained was purified by silica gel column chromatography (7:3 EtOAc/hexane) to supply compound **2m** quantitatively as a brown oil (50 mg, 0.14 mmol, 100%). IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3352, 3055, 2924, 2854, 1716, 1637, 1559, 1456, 1331, 1117.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 3.33 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.64 (t,  $J = 4.7$  Hz, 4H, 2  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.72 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.80 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.88 (t,  $J = 4.7$  Hz, 4H, 2  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 6.79 (s, 1H), 6.91 (s, 1H), 7.08 (ddd,  $J = 8.0, 7.1, 1.0$  Hz, 1H), 7.22 (ddd,  $J = 8.2, 7.1, 1.1$  Hz, 1H), 7.37 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.60 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 10.57 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 43.1, 48.6 (2C), 59.2, 66.4 (2C), 69.7, 109.0, 110.9, 111.3, 120.2, 121.4, 124.1, 128.3, 135.1, 136.4, 138.0, 160.0, 171.1. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 355.1765. Found 355.1762.

**(E)-3,5-Dihydro-5-((1H-Indol-2-yl)-(2-methoxyethylamino)methylene)-3-(2-methoxyethyl)-2-methyl-4H-imidazol-4-one (3q)**

The general procedure, starting from (Z)-3,5-Dihydro-5-((3-iodo-1H-indol-2-yl)methylene)-3-(2-methoxyethyl)-2-methyl-4H-imidazol-4-one (**11b**, 82 mg, 0.20

mmol) and 2-methoxyethylamine, after 24 hours of reaction and purification by silica gel column chromatography (1:1 EtOAc/hexane) gave compound **3q** as an orange solid (51 mg, 0.14 mmol, 72%). Mp.: 116–118 °C. IR (NaCl)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3279, 2925, 1626, 1469, 1121.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.37 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.31 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.48 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.59 (t,  $J = 5.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.73 (t,  $J = 5.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.86 (t,  $J = 5.3$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.93–3.99 (m, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 7.11 (t,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.29 (dd,  $J = 8.2, 7.2$  Hz, 1H), 7.50 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.67 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 9.73 (br s, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ), 12.23 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 15.0, 40.8, 46.2, 59.1, 59.4, 71.1, 71.4, 109.2, 112.2, 114.0, 120.4, 121.7, 124.8, 127.6, 129.4, 137.1, 145.7, 146.9, 167.5. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 357.1921. Found 357.1930.

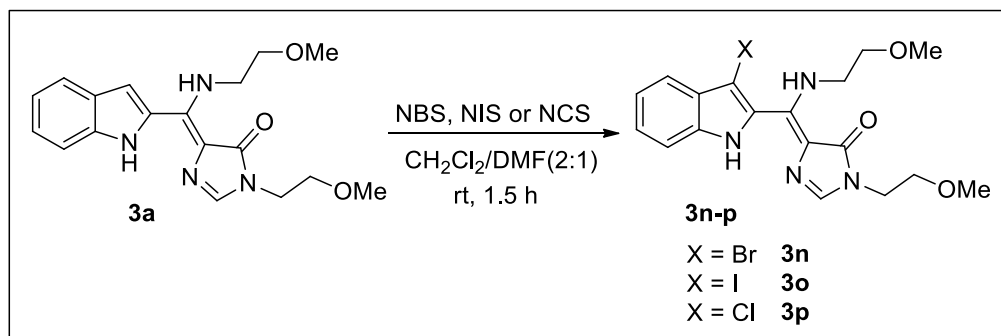
**(E)-3,5-Dihydro-5-((1*H*-indol-2-yl)-(2-methoxyethylamino)methylene)-3-(2-methoxyethyl)-2-phenyl-4*H*-imidazol-4-one (3r)**



The general procedure, starting from (*Z*)-3,5-dihydro-5-((3-iodo-1*H*-indol-2-yl)methylene)-3-(2-methoxyethyl)-2-phenyl-4*H*-imidazol-4-one (**11c**, 82 mg, 0.20 mmol) and 2-methoxyethylamine, after 24 hours of reaction and purification by silica gel column chromatography (3:7 EtOAc/hexane) gave compound **3r** as an orange solid (79 mg, 0.19 mmol, 94%). Mp.: 109–111 °C. IR (KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3258, 2964, 2344, 1627, 1261.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 3.28 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.51 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.67 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.79 (t,  $J = 5.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.02–4.04 (m, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 4.06 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 7.13 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.23 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H), 7.27–7.31 (m, 1H), 7.46–7.52 (m, 4H), 7.70 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.81 (dd,  $J = 7.8, 1.5$  Hz, 2H), 10.12 (br s, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ), 12.42 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 41.7, 46.5, 59.1, 59.5, 70.3, 71.3, 109.8, 112.3, 115.0,

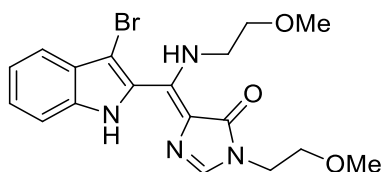
120.5, 121.8, 125.0, 127.5, 128.7 (4C), 129.1, 129.4, 130.9, 137.1, 146.2, 148.2, 167.9. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $C_{24}H_{27}N_4O_2$   $[M+H]^+$ : 419.2077. Found 419.2073.

### General procedure for the preparation of halogenated compounds **3n-p**



To a stirred solution of compound **3a** (103 mg, 0.30 mmol) in dry DMF:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9 mL, 1:2), the corresponding *N*-halosuccinimide (0.30 mmol) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 1.5 hours. Then, the reaction mixture was washed with brine and the aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layer was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography to give the corresponding halogenated amino product.

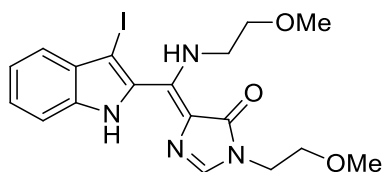
### (*E*)-5-((3-Bromo-1*H*-indol-2-yl)-(2-methoxyethylamino)methylene)-3,5-dihydro-3-(2-methoxyethyl)-4*H*-imidazol-4-one (**3n**)



The general procedure, using *N*-bromosuccinimide (NBS, 53 mg, 0.30 mmol), after purification by silica gel column chromatography (2:98 MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) gave compound **3n** as an orange oil (90 mg, 0.21 mmol, 71%). IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>: 3103, 2926, 2891, 2456, 2243, 1654, 1610, 1458, 1278, 1117. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 3.37 (s, 6H, 2 OCH<sub>3</sub>), 3.53–3.64 (m, 6H, 3 CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.85 (t,  $J$  = 5.1 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 6.73 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 6.92 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 7.07 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1H),

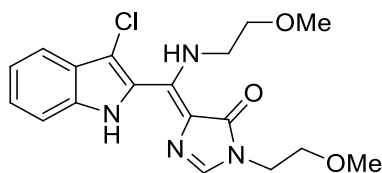
7.29 (s, 1H), 7.53 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 9.54 (br s, 1H, NH), 11.45 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 41.0, 45.4, 58.9, 59.0, 71.0, 71.8, 94.3, 112.1, 115.9, 119.2, 120.7, 124.2, 124.8, 127.0, 136.1, 139.8, 149.9, 166.4. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}^{79}\text{BrN}_4\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 421.0870. Found 421.0859.

**(*E*)-3,5-Dihydro-5-((3-iodo-1*H*-indol-2-yl)-(2-methoxyethylamino)methylene)-3-(2-methoxyethyl)-4*H*-imidazol-4-one (3o)**



The general procedure, using *N*-iodosuccinimide (NIS, 68 mg, 0.30 mmol), after purification by silica gel column chromatography (2:98 MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) gave compound **3o** as a brown oil (95 mg, 0.23 mmol, 78%). IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3168, 2928, 1611, 1541, 1448, 1332, 1278, 1117, 1011.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 3.36 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.38 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.46–3.56 (m, 4H, 2  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.61 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.85 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 6.64 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 6.87 (t,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.06 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.40 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 9.47 (br s, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ), 11.54 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 40.9, 45.3, 58.9, 59.0, 62.5, 70.9, 71.7, 112.1, 116.0, 120.8, 120.9, 124.0, 128.8, 130.2, 136.6, 140.0, 150.8, 166.3. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{IN}_4\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 469.0731. Found 469.0723.

**(*E*)-5-((3-Chloro-1*H*-indol-2-yl)-(2-methoxyethylamino)methylene)-3,5-dihydro-3-(2-methoxyethyl)-4*H*-imidazol-4-one (3p)**



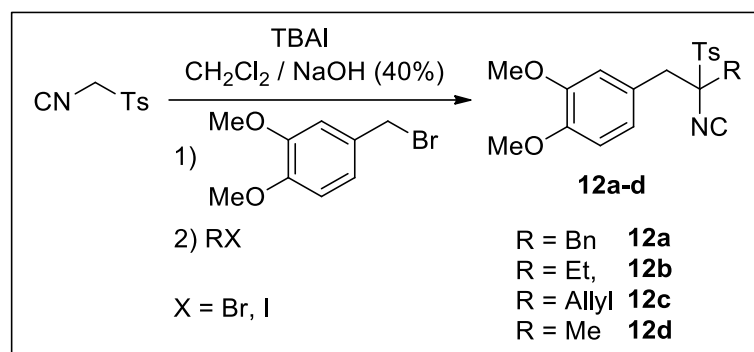
The general procedure, using *N*-chlorosuccinimide (NCS, 40 mg, 0.30 mmol), after purification by silica gel column chromatography (2:98 MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) gave compound **3p** as a yellow oil (29 mg, 0.08 mmol, 26%). IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3059,

2925, 1778, 1710, 1639, 1530, 1350, 1120.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 3.37 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.50 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.64 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.74 (t,  $J = 5.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.90–3.97 (m, 4H, 2  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 7.14 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.19 (br s, 1H), 7.32 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.52 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.68 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 9.81 (br s, 1H, NH), 11.48 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 40.9, 46.4, 59.1, 59.4, 70.0, 71.3, 110.4, 112.4, 114.0, 120.8, 122.0, 125.3, 127.5, 127.9, 132.5, 137.3, 148.5, 165.8. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}^{35}\text{ClN}_4\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 377.1375. Found 377.1356.

## Experimental details and characterization data for compounds of Chapter 4.

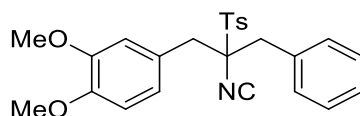
### Part I. Isoquinolines

#### General procedure for the preparation of $\alpha$ -benzyl TosMIC derivatives 12a-d

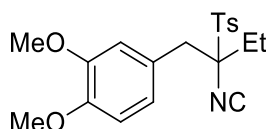


To a stirred solution of 4-(bromomethyl)-1,2-dimethoxybenzene (231 mg, 1 mmol), tosylmethylisocyanide (TosMIC, 195 mg, 1 mmol) and tetrabutylammonium iodide (TBAI, 74 mg, 0.2 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (7.5 mL), was added, at 0 °C, a solution of NaOH (40% in  $\text{H}_2\text{O}$ , 7.5 mL), and the reaction mixture was vigorously stirred at the same temperature for 1h. Then, the reaction mixture was warmed to room temperature and the corresponding alkyl bromide or alkyl iodide was added. Stirring was maintained at the same temperature for 24 h and then, water (10 mL) was added, and the two layers were separated. The aqueous layer was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The combined organic layers were dried with anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure to give a crude product. The crude product was purified by silica gel column chromatography to give the corresponding  $\alpha$ -benzyl TosMIC derivative. These derivatives are only fairly stable and must be stored in the refrigerator at -10 – -20 °C.



**4-[2-Isocyano-2-[(4-methylphenyl)sulfonyl]-3-phenylpropyl]-1,2-dimethoxybenzene (12a)<sup>8</sup>**

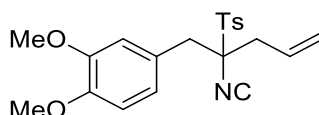
The general procedure, using benzyl bromide (171 mg, 0.12 mL, 1 mmol), after purification by silica gel column chromatography (2:8 EtOAc/hexane) gave compound **12a** as a yellow solid (304 mg, 0.70 mmol, 70%). Mp.: 118–120 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 2964, 2121, 1594, 1517, 758.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.43 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.11 (d,  $J = 14.5$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 3.23 (d,  $J = 14.5$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 3.30 (d,  $J = 14.1$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 3.41 (d,  $J = 14.1$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 3.72 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.82 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.57 (s, 1H), 6.62 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 6.71 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.12–7.23 (m, 2H), 7.24–7.26 (m, 3H), 7.31 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, C(3,5 arom)H), 7.96 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, C(2,6 arom)H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 21.7, 39.4, 39.6, 55.8 (2C), 81.8, 110.7, 113.5, 123.2, 124.7, 127.9, 128.4 (2C), 129.7 (2C), 130.6, 130.9 (2C), 131.2 (2C), 132.4, 146.2, 148.6, 148.8, 166.6 ( $\text{N}=\text{C}$ :). HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{NO}_4\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 436.1577. Found 436.1583.

**4-[2-Isocyano-2-[(4-methylphenyl)sulfonyl]butyl]-1,2-dimethoxybenzene (12b)<sup>8</sup>**

The general procedure, using ethyl iodide (936 mg, 0.48 mL, 6 mmol), after purification by silica gel column chromatography (2:8 EtOAc/hexane) gave compound **12b** as a yellow solid (273 mg, 0.73 mmol, 73%). Mp.: 120–121 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 2955, 2132, 1593, 1146, 851.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.96 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.85–1.92 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 2.00–2.08 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 2.48 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.07 (d,  $J = 13.9$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 3.20 (d,  $J = 13.9$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 3.82 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.84 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.77–6.78 (m, 3H), 7.41 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, C(3,5 arom)H), 7.88 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, C(2,6 arom)H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.8, 21.8, 26.1, 38.9, 55.8, 55.9, 82.0, 110.9, 113.4, 122.9, 124.4, 128.2, 129.9 (2C), 131.1 (2C), 146.4,

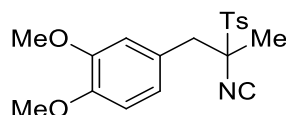
148.8, 148.9, 165.1 (N=C:). HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $C_{20}H_{24}NO_4S$   $[M+H]^+$ : 374.1421. Found 374.1429.

**4-[2-Isocyano-2-[(4-methylphenyl)sulfonyl]pent-4-enyl]-1,2-dimethoxybenzene (12c)<sup>8</sup>**



The general procedure, using allyl iodide (336 mg, 0.18 mL, 2 mmol), after purification by silica gel column chromatography (2:8 EtOAc/hexane) gave compound **12c** as a green oil (300 mg, 0.78 mmol, 78%). IR (NaCl)  $\nu_{\max}$   $cm^{-1}$ : 2934, 2123, 1595, 1518, 1153, 815.  $^1H$ -NMR (300 MHz  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.46 (s, 3H,  $CH_3$ ), 2.58 (dd,  $J = 15.4, 6.3$  Hz, 1H,  $\underline{CH_2}CH=CH_2$ ), 2.71 (dd,  $J = 15.4, 6.3$  Hz, 1H,  $\underline{CH_2}CH=CH_2$ ), 3.13 (d,  $J = 14.0$  Hz, 1H,  $CH_2$ ), 3.22 (d,  $J = 14.0$  Hz, 1H,  $CH_2$ ), 3.86 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 3.87 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 5.05 (dd,  $J = 16.8, 1.3$  Hz, 1H,  $CH_2CH=\underline{CH_2}$ ), 5.13 (dd,  $J = 10.2, 1.3$  Hz, 1H,  $CH_2CH=\underline{CH_2}$ ), 5.60–5.69 (m, 1H,  $CH_2\text{CH}=\underline{CH_2}$ ), 6.76–6.78 (m, 3H), 7.38 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, C(3,5 arom)H), 7.86 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, C(2,6 arom)H).  $^{13}C$ -NMR (75 MHz  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) 21.7, 37.6, 38.5, 55.7, 55.8, 81.4, 110.9, 113.6, 120.9, 123.2, 124.1, 129.4, 129.8 (2C), 130.2, 131.3 (2C), 146.5, 148.7, 148.8, 165.6 (N=C:). HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $C_{21}H_{24}NO_4S$   $[M+H]^+$ : 386.1421. Found 386.1410.

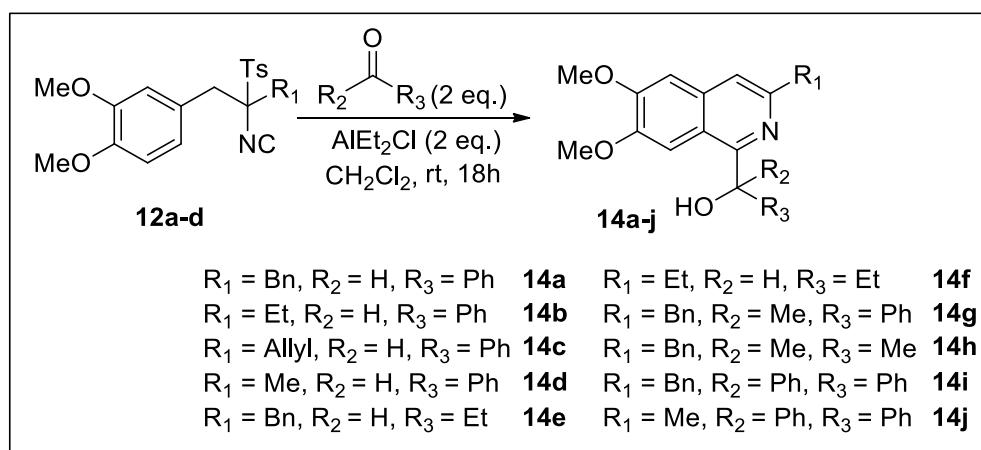
**4-[2-Isocyano-2-[(4-methylphenyl)sulfonyl]propyl]-1,2-dimethoxybenzene (12d)**



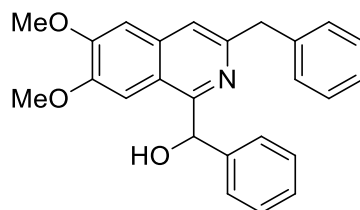
The general procedure, using methyl iodide (852 mg, 0.37 mL, 6 mmol), after purification by silica gel column chromatography (2:8 EtOAc/hexane) gave compound **12d** as a pale-yellow solid (255 mg, 0.71 mmol, 71%). Mp.: 128–130 °C. IR (KBr)  $\nu_{\max}$   $cm^{-1}$ : 2960, 2936, 2129, 1593, 1516, 1329, 1239, 1144, 1023, 819.  $^1H$ -NMR (500 MHz  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.53 (s, 3H,  $CH_3$ ), 2.50 (s, 3H,  $CH_3$ ), 3.18 (d,  $J = 13.6$  Hz, 1H,  $CH_2$ ), 3.24 (d,  $J = 13.6$  Hz, 1H,  $CH_2$ ), 3.89 (s, 6H, 2  $OCH_3$ ), 6.79 (br s, 1H), 6.80 (dd,  $J = 8.7,$

2.0 Hz, 1H), 6.84 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 7.45 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H, C(3,5 arom)H), 7.93 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H, C(2,6 arom)H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 20.1, 21.6, 38.8, 55.7, 55.8, 78.8, 111.0, 113.5, 122.9, 124.1, 129.2, 129.8 (2C), 131.2 (2C), 146.4, 148.7, 148.8, 164.6 (N=C:). HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{NO}_4\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 360.1264. Found 360.1281.

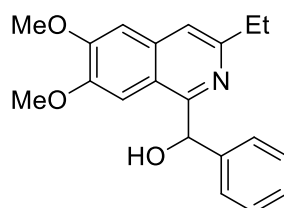
### General procedure for the preparation of compounds **14a-j**



To a stirred solution of the corresponding  $\alpha$ -(3,4-dimethoxybenzyl) TosMIC derivative **12a-d** (1 mmol) and the aldehyde or ketone (2 mmol) in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL), at 0 °C and under argon atmosphere, was added dropwise during 5 min, a solution of  $\text{AlEt}_2\text{Cl}$  (1M in hexane, 2 mmol, 2.00 mL) and the reaction mixture was stirred at the same temperature for additional 15 min. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 18 h at the same temperature. Then, saturated aq.  $\text{NaHCO}_3$  solution (20 mL) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min. The reaction was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography to supply the corresponding isoquinoline.

**(3-Benzyl-6,7-dimethoxy-1-isoquinolyl)phenyl methanol (14a)**

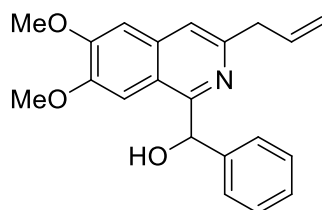
The general procedure, starting from **12a** (435 mg, 1 mmol), and benzaldehyde (212 mg, 0.20 mL, 2 mmol), after purification by silica gel column chromatography (2:8 EtOAc/hexane) supplied compound **14a** as a yellow solid (308 mg, 0.80 mmol, 80%). Mp.: 139–140 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3259, 2965, 1574, 1279, 703.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 3.77 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.92 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.34 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 6.16 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 7.21–7.40 (m, 11H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 43.8, 55.7, 55.9, 72.6, 103.0, 105.0, 117.9, 119.1, 126.3, 127.7 (2C), 127.8, 128.5 (2C), 128.6 (2C), 129.4 (2C), 134.4, 139.8, 143.4, 149.3, 150.2, 152.6, 155.9. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{NO}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 386.1750. Found 386.1738.

**(3-Ethyl-6,7-dimethoxy-1-isoquinolyl)phenyl methanol (14b)**

The general procedure, starting from **12b** (373 mg, 1 mmol), and benzaldehyde (212 mg, 0.20 mL, 2 mmol), after purification by silica gel column chromatography (2:8 EtOAc/hexane) supplied compound **14b** as a white solid (320 mg, 0.99 mmol, 99%). Mp.: 109–111 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3295, 2966, 1576, 1510, 1417, 1214, 705.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.43 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.00 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.76 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.95 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.14 (s, 1H), 6.99 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 7.22 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 7.28 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 7.32–7.36 (m, 3H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 13.9, 30.2, 55.7, 55.8, 72.6, 103.7, 104.8, 116.6, 119.0,

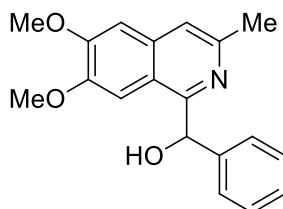
127.7 (2C), 127.8, 128.6 (2C), 134.4, 143.6, 149.1, 152.5, 152.6, 155.6. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $C_{20}H_{22}NO_3$   $[M+H]^+$ : 324.1594. Found 324.1603.

**(3-Allyl-6,7-dimethoxy-1-isoquinolyl)phenyl methanol (14c)**



The general procedure, starting from **12c** (385 mg, 1 mmol), and benzaldehyde (212 mg, 0.20 mL, 2 mmol), after purification by silica gel column chromatography (2:8 EtOAc/hexane) supplied compound **14c** as a yellow oil (312 mg, 0.93 mmol, 93%). IR (KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3295, 2936, 1575, 1509, 1421, 1256, 1161, 702.  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 3.75–3.78 (m, 5H), 3.95 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 5.18–5.26 (m, 2H), 6.15 (s, 1H), 6.16–6.24 (m, 1H), 7.00 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 7.23 (tt,  $J = 7.2, 2.3$  Hz, 1H), 7.29 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 7.33–7.37 (m, 3H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 41.9, 55.7, 55.9, 72.6, 103.1, 104.9, 116.7, 117.5, 119.2, 127.7 (2C), 127.8, 128.6 (2C), 134.4, 136.0, 143.5, 149.2, 149.3, 152.7, 155.9. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $C_{21}H_{22}NO_3$   $[M+H]^+$ : 336.1594. Found 336.1588.

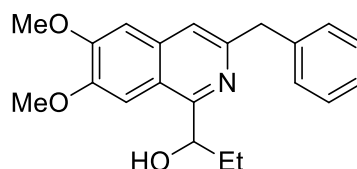
**(6,7-Dimethoxy-3-methyl-1-isoquinolyl)phenyl methanol (14d)**



The general procedure, starting from **12d** (359 mg, 1 mmol), and benzaldehyde (212 mg, 0.20 mL, 2 mmol), after purification by silica gel column chromatography (2:8 EtOAc/hexane) supplied compound **14d** as a yellow solid (291 mg, 0.94 mmol, 94%). Mp.: 143–144 °C. IR (KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3297, 3007, 1575, 1508, 1416, 1255, 1018, 708.  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.70 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.75 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.94 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.14 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 7.22 (t,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 7.28 (t,  $J =$

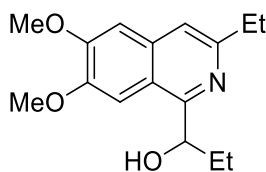
7.6 Hz, 2H), 7.30–7.36 (m, 3H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 23.8, 55.7, 55.8, 72.6, 103.1, 104.7, 117.9, 118.8, 127.7 (2C), 127.8, 128.6 (2C), 134.4, 143.5, 147.4, 149.1, 152.6, 155.6. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{NO}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 310.1438. Found 310.1435.

**1-(3-Benzyl-6,7-dimethoxy-1-isoquinolyl)propan-1-ol (14e)**



The general procedure, starting from **12a** (435 mg, 1 mmol), and propionaldehyde (116 mg, 0.14 mL, 2 mmol), after purification by silica gel column chromatography (2:8 EtOAc/hexane) supplied compound **14e** as a yellow oil (273 mg, 0.81 mmol, 81%). IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3367, 2962, 2931, 1624, 1508, 1225, 872.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.97 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.67–1.77 (m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_3$ ), 2.00–2.08 (m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_3$ ), 3.97 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.00 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.25 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.28 (dd, 1H,  $J = 7.1, 3.6$  Hz,  $\text{CHOH}$ ), 5.42 (br s, 1H, OH), 6.99 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.21–7.25 (m, 1H), 7.28–7.35 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 9.5, 31.5, 43.8, 55.9 (2C), 70.2, 102.2, 105.3, 117.3, 118.8, 126.2, 128.5 (2C), 129.2 (2C), 134.2, 139.8, 149.5, 150.7, 152.7, 157.9. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{NO}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 338.1750. Found 338.1738.

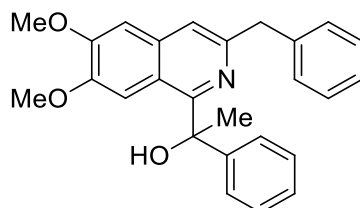
**1-(3-Ethyl-6,7-dimethoxy-1-isoquinolyl)propan-1-ol (14f)**



The general procedure, starting from **12b** (373 mg, 1 mmol), and propionaldehyde (116 mg, 0.14 mL, 2 mmol), after purification by silica gel column chromatography (3:7 EtOAc/hexane) supplied compound **14f** as a yellow oil (222 mg, 0.81 mmol, 81%). IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3393, 2965, 1450, 1420.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.96 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.34 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.66–1.71 (m, 1H,

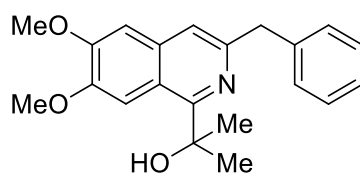
CHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.99–2.04 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.88 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.00 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.01 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 5.26 (dd,  $J = 7.2, 3.3$  Hz, 1H, CHOH), 7.04 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.27 (s, 1H). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 9.5, 13.8, 29.6, 30.5, 31.4, 55.9, 70.2, 102.2, 105.1, 115.8, 118.6, 134.2, 149.3, 152.7, 153.2, 157.7. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 276.1594. Found 276.1601.

### 1-(3-Benzyl-6,7-dimethoxy-1-isoquinolyl)-1-phenyl ethanol (14g)



The general procedure, starting from **12a** (435 mg, 1 mmol), and acetophenone (240 mg, 0.23 mL, 2 mmol), after purification by silica gel column chromatography (2:8 EtOAc/hexane) supplied compound **14g** as a yellow oil (319 mg, 0.80 mmol, 80%). IR (NaCl)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3418, 2931, 2112, 1466, 1215, 702. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 2.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.52 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.33 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 6.85 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 7.18–7.44 (m, 10H), 7.64 (s, 1H). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 27.5, 43.9, 55.6, 55.8, 74.2, 105.1, 105.3, 118.3, 118.4, 126.3, 126.8 (2C), 127.4, 128.4 (2C), 128.6 (2C), 129.3 (2C), 135.4, 139.7, 146.7, 148.6, 149.4, 152.2, 160.2. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for C<sub>26</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 400.1906. Found 400.1899.

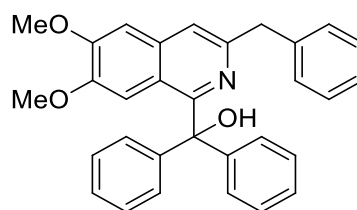
### 2-(3-Benzyl-6,7-dimethoxy-1-isoquinolyl)propan-2-ol (14h)



The general procedure, starting from **12a** (435 mg, 1 mmol), and acetone (116 mg, 0.15 mL, 2 mmol), after purification by silica gel column chromatography (3:7 EtOAc/hexane) supplied compound **14h** as a yellow oil (307 mg, 0.91 mmol, 91%). IR (NaCl)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3277, 2970, 2829, 1570, 1220, 1026, 777. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz

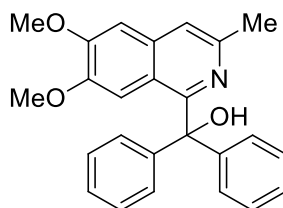
CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 1.81 (s, 6H, 2 CH<sub>3</sub>), 3.98 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.01 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.25 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 7.00 (s, 1H), 7.15–7.21 (m, 2H), 7.21–7.26 (m, 1H), 7.30–7.35 (m, 4H), 7.51 (s, 1H). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 30.3 (2C), 43.7, 55.8, 55.9, 71.3, 105.1, 105.7, 117.9, 118.2, 126.3, 128.5 (2C), 129.3 (2C), 135.5, 139.5, 148.8, 149.5, 152.2, 161.1. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 338.1750. Found 338.1739.

**(3-Benzyl-6,7-dimethoxy-1-isoquinolyl)diphenyl methanol (14i)**

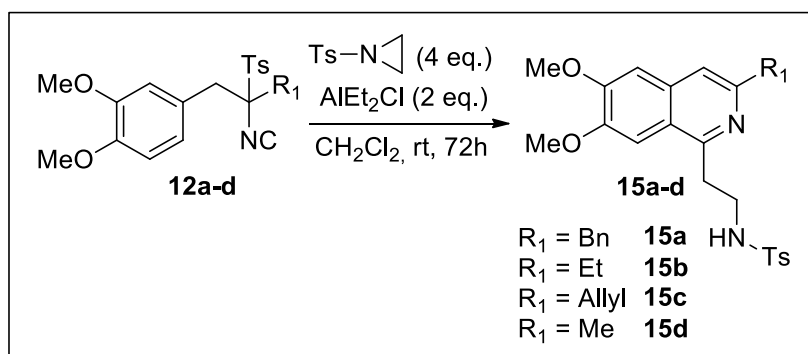


The general procedure, starting from **12a** (435 mg, 1 mmol), and benzophenone (364 mg, 2 mmol), after purification by silica gel column chromatography (2:8 EtOAc/hexane) supplied compound **14i** as a white solid (249 mg, 0.54 mmol, 54%). Mp.: 154–156 °C. IR (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3245, 2958, 1508, 1251, 1156, 1013, 705. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 3.37 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.93 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.32 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 6.85 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 7.20–7.45 (m, 15H), 8.22 (s, 1H). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 43.7, 55.7, 55.9, 80.1, 104.9, 106.6, 118.8, 120.6, 126.4 (2C), 127.3 (2C), 127.9 (4C), 128.6 (2C), 128.8 (4C), 129.3 (2C), 135.6, 139.4, 145.9, 148.7, 149.8, 152.2, 158.7. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for C<sub>31</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 462.2062. Found 462.2034.



**(6,7-Dimethoxy-3-methyl-1-isoquinolyl)diphenyl methanol (14j)**

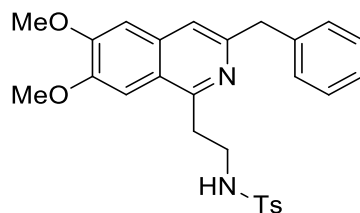
The general procedure, starting from **12d** (359 mg, 1 mmol), and benzophenone (364 mg, 2 mmol), after purification by silica gel column chromatography (2:8 EtOAc/hexane) supplied compound **14j** as a white solid (227 mg, 0.59 mmol, 59%). Mp.: 184–186 °C. IR (KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3269, 2954, 1507, 1251, 1220, 1011, 771.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.67 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.36 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.97 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.82 (s, 1H), 6.97 (s, 1H), 7.22–7.32 (m, 6H), 7.32–7.40 (m, 4H), 8.27 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 23.6, 55.6, 55.9, 80.1, 104.5, 106.5, 118.8, 120.2, 127.3 (2C), 127.9 (4C), 128.8 (4C), 135.7, 146.0 (2C), 146.9, 148.5, 152.3, 158.4. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{NO}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 386.1750. Found 386.1741.

**General procedure for the preparation of compounds 15a-d**

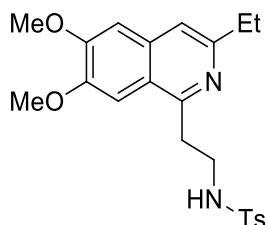
To a stirred solution of the corresponding  $\alpha$ -arylmethyl TosMIC derivative **12a-d** (1 mmol), and *N*-tosylaziridine (788 mg, 4 mmol) in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL), at 0 °C and under argon atmosphere, was added dropwise during 5 min, a solution of  $\text{AlEt}_2\text{Cl}$  (1M in hexane, 4 mmol, 4.00 mL) and the reaction mixture was stirred at the same temperature for additional 15 min. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 72 h at the same temperature. Then, saturated aq.  $\text{NaHCO}_3$

solution (20 mL) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography to supply the corresponding isoquinoline.

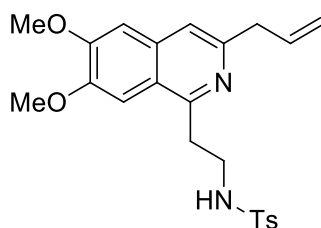
***N*-[2-(3-Benzyl-6,7-dimethoxy-1-isoquinolyl)ethyl]-4-methylbenzenesulfonamide (**15a**)**



The general procedure, starting from **12a** (435 mg, 1 mmol), after purification by silica gel column chromatography (4:6 EtOAc/hexane) supplied compound **15a** as a yellow oil (448 mg, 0.94 mmol, 94%). IR (NaCl)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3280, 2923, 1572, 1508, 1253, 1159, 813. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 2.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.30 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.50 (q, *J* = 5.6 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.97 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.98 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.14 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 6.23 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, NH), 6.93 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 7.14–7.17 (m, 3H), 7.20–7.33 (m, 5H), 7.59 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, C(2,6 arom)H). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 21.4, 32.4, 41.1, 43.8, 56.0 (2C), 102.5, 105.1, 116.9, 121.1, 126.3, 126.8 (2C), 128.6 (2C), 129.0 (2C), 129.4 (2C), 133.8, 137.4, 140.0, 142.8, 149.6, 151.5, 152.9, 155.3. HRMS (ESI-TOF) *m/z* calculated for C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 477.1841. Found 477.1843.

***N*-(2-(3-Ethyl-6,7-dimethoxy-1-isoquinolyl)ethyl)-4-methylbenzenesulfonamide (15b)**

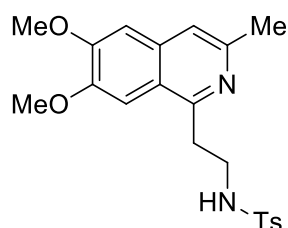
The general procedure, starting from **12b** (373 mg, 1 mmol), after purification by silica gel column chromatography (4:6 EtOAc/hexane) supplied compound **15b** as a yellow oil (410 mg, 0.99 mmol, 99%). IR (KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3291, 2965, 2929, 1509, 1327, 1160, 1094.  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.32 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2.34 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.85 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.36 (t,  $J = 5.3$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.52 (q,  $J = 5.3$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.99 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.00 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.52–6.62 (m, 1H), 6.98 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.23 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, C(3, 5 arom)H), 7.75 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, C(2, 6 arom)H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 14.1, 21.4, 30.8, 32.4, 41.2, 55.9, 56.0, 102.4, 105.1, 115.4, 121.0, 127.0 (2C), 129.6 (2C), 133.8, 137.3, 143.0, 149.5, 152.7, 153.9, 155.2. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 415.1686. Found 415.1687.

***N*-[2-(3-Allyl-6,7-dimethoxy-1-isoquinolyl)ethyl]-4-methylbenzenesulfonamide (15c)**

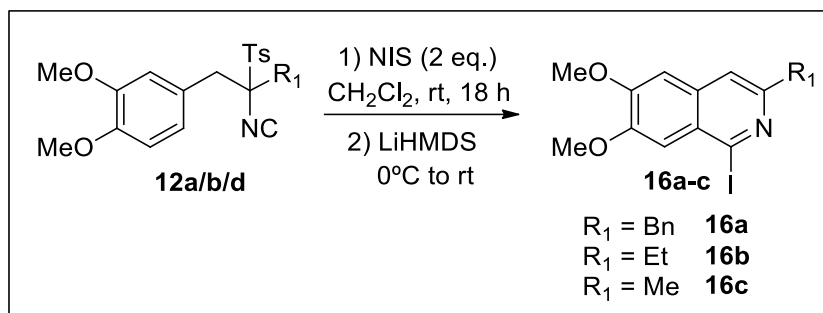
The general procedure, starting from **12c** (385 mg, 1 mmol), after purification by silica gel column chromatography (4:6 EtOAc/hexane) supplied compound **15c** as a yellow oil (247 mg, 0.58 mmol, 58%). IR (NaCl)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3300, 2938, 1573, 1509, 1428, 1327, 1160, 1094.  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.37 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.33 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.47–3.54 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.58 (d,  $J = 6.8$  Hz,

2H,  $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 3.98 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.99 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 5.14–5.21 (m, 2H), 6.02–6.10 (m, 1H), 6.55 (br s, 1H, NH), 6.97 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.23 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, C(3,5 arom)H), 7.74 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, C(2, 6 arom)H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 21.4, 32.5, 41.1, 42.2, 56.0 (2C), 102.6, 105.0, 116.5, 116.7, 121.1, 126.9 (2C), 129.5 (2C), 133.6, 136.3, 137.4, 142.9, 149.7, 150.4, 152.7, 155.5. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 427.1685. Found 427.1689.

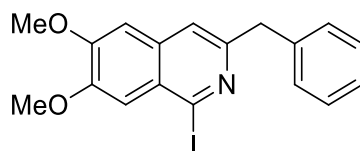
***N*-[2-(6,7-Dimethoxy-3-methyl-1-isoquinolyl)ethyl]-4-methylbenzenesulfonamide (**15d**)**



The general procedure, starting from **12d** (359 mg, 1 mmol), after purification by silica gel column chromatography (4:6 EtOAc/hexane) supplied compound **15d** as a yellow oil (320 mg, 0.80 mmol, 80%). IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3286, 2924, 1572, 1509, 1428, 1326, 1252, 1160, 1094.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.38 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.58 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.37 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.47–3.52 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 4.00 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.01 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.40 (br s, 1H, NH), 6.95 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.23 (d,  $J = 6.7$  Hz, 2H, C(3,5 arom)H), 7.25 (s, 1H), 7.75 (d,  $J = 6.7$  Hz, 2H, C(2,6 arom)H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 21.5, 23.8, 32.6, 41.4, 43.8, 56.0, 56.1, 102.7, 104.8, 116.9, 120.9, 126.9 (2C), 128.5 (2C), 133.8, 137.2, 143.0, 148.4, 149.7, 153.0, 155.0. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 401.1529. Found 401.1531.

General procedure for the preparation of compounds **16a-c**

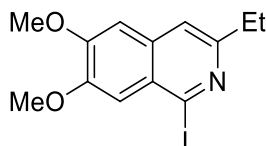
A solution of the corresponding  $\alpha$ -arylmethyl TosMIC derivative **12a/b/d** (1 mmol), and *N*-iodosuccinimide (450 mg, 2 mmol) in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL), under argon atmosphere, was vigorously stirred at room temperature for 18 h. Then, the reaction mixture was cooled down to 0 °C and LiHMDS (1M in *tert*-butyl-methylether, 4 mL, 4 mmol) was added dropwise. The stirring was continued at the same temperature for 15 min and then at room temperature for the time required for the removal of the tosyl group. The mixture was quenched with water (10 mL), extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography to supply the corresponding iodinated isoquinoline.

3-Benzyl-1-iodo-6,7-dimethoxy-isoquinoline (**16a**)

The general procedure, starting from **12a** (435 mg, 1 mmol), after 3 hours of stirring and purification by silica gel column chromatography (3:7 EtOAc/hexane) supplied compound **16a** as a yellow solid (389 mg, 0.96 mmol, 96%). Mp.: 155–156 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 2961, 2929, 1558, 1508, 1244, 1211, 1143, 834.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 3.96 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.04 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.25 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 6.84 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 7.23–7.29 (m, 1H), 7.29–7.38 (m, 5H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 44.2, 56.1, 56.2, 104.8, 110.9, 118.3, 124.2, 126.3, 126.4, 128.6 (2C),

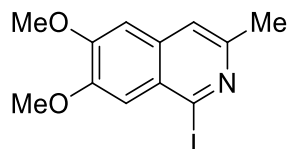
129.4 (2C), 133.1, 139.2, 150.9, 153.4, 154.3. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $C_{18}H_{17}INO_2$   $[M+H]^+$ : 406.0299. Found 406.0299.

### 3-Ethyl-1-iodo-6,7-dimethoxy-isoquinoline (16b)



The general procedure, starting from **12b** (373 mg, 1 mmol), after 3 hours of stirring and purification by silica gel column chromatography (3:7 EtOAc/hexane) supplied compound **16b** as an orange solid (288 mg, 0.84 mmol, 84%). Mp.: 147–148 °C. IR (KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 2964, 2361, 1590, 1241, 868.  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.33 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2.89 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4.01 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.05 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.93 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.31 (s, 1H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 14.0, 30.5, 56.1, 56.3, 104.7, 111.0, 116.9, 124.1, 126.2, 133.3, 150.7, 153.4, 156.8. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $C_{13}H_{15}INO_2$   $[M+H]^+$ : 344.0143. Found 344.0142.

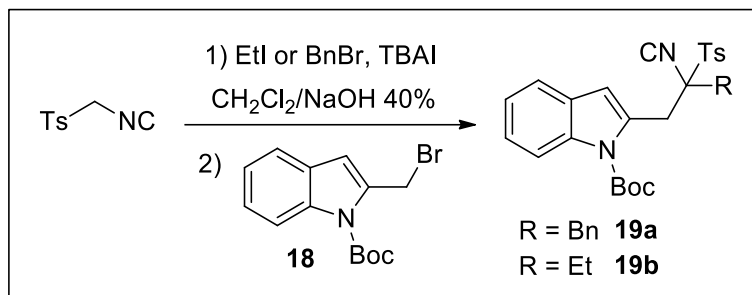
### 1-Iodo-6,7-dimethoxy-3-methyl-isoquinoline (16c)



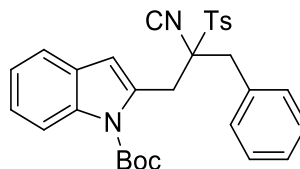
The general procedure, starting from **12d** (359 mg, 1 mmol), after 24 hours of stirring and purification by silica gel column chromatography (3:7 EtOAc/hexane) supplied compound **16c** as a white solid (234 mg, 0.71 mmol, 71%). Mp.: 159–161 °C. IR (KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3004, 2967, 2914, 1503, 1413, 1247, 1151, 1015.  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.57 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.98 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.01 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.84 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 7.23 (s, 1H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 23.9, 56.0, 56.2, 104.3, 111.9, 118.3, 124.0, 126.0, 133.1, 150.6, 151.2, 153.3. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $C_{12}H_{13}INO_2$   $[M+H]^+$ : 329.9987. Found 329.9991.

## Part II. $\gamma$ -Carbolines

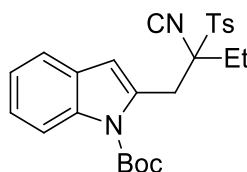
### General procedure for the preparation of $\alpha$ -(2-indolylmethyl) TosMIC derivatives **19a/b**



To a stirred solution of tosylmethylisocyanide (TosMIC, 195 mg, 1 mmol) and tetrabutylammonium iodide (TBAI, 74 mg, 0.2 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL), was added, at 0 °C, a solution of NaOH (40% in H<sub>2</sub>O, 2 mL). Then, benzyl bromide or ethyl iodide was added and the reaction mixture was vigorously stirred at room temperature until TosMIC could not be detected by TLC. Then, a solution of 2-bromomethyl-1-(*tert*-butoxycarbonyl)indole<sup>269</sup> (**18**, 403 mg, 1.3 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) was added, and the reaction was cooled to 0 °C. A solution of NaOH (40% in H<sub>2</sub>O, 4 mL) was added, the reaction mixture was warmed to room temperature and stirring was maintained at the same temperature for 24 h. Then, water (5 mL) was added, and the two layers were separated. The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic layers were dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography to supply the corresponding  $\alpha$ -(2-indolylmethyl) TosMIC derivative. These derivatives are only fairly stable and must be stored at -10 – -20 °C.

***tert*-Butyl 2-(2-isocyano-3-phenyl-2-tosylpropyl)-1*H*-indole-1-carboxylate (19a)**

The general procedure, using benzyl bromide (171 mg, 0.12 mL, 1 mmol) and stirring for 2 hours before the addition of the bromomethylindole derivative, after purification by silica gel column chromatography (1:9 EtOAc/hexane) supplied compound **19a** as white needles (462 mg, 0.87 mmol, 87%). Mp.: 52–54 °C. IR (NaCl)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 2978, 2122, 1734, 1453, 1328, 1150, 1087.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.72 (s, 9H, Boc), 2.42 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.34 (d,  $J = 14.3$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 3.59 (d,  $J = 14.3$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 4.02 (d,  $J = 1.9$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6.60 (s, 1H, C(3)H), 7.21–7.32 (m, 9H), 7.44 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.81–7.85 (m, 2H), 8.02 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H). HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 515.1999. Found 515.1996.

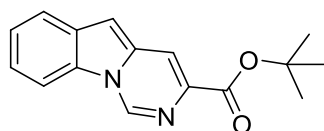
***tert*-Butyl 2-(2-isocyano-2-tosylbutyl)-1*H*-indole-1-carboxylate (19b)**

The general procedure, using ethyl iodide (312 mg, 0.16 mL, 2 mmol) and stirring overnight before the addition of the bromomethylindole derivative, after purification by silica gel column chromatography (1:9 EtOAc/hexane) supplied compound **19b** as a colorless oil (350 mg, 0.83 mmol, 83%). IR (NaCl)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 2980, 2943, 2123, 1733, 1453, 1329, 1157, 1121.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.01 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.69 (s, 9H, Boc), 2.05–2.11 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2.24–2.30 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2.49 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.77 (d,  $J = 14.9$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 4.14 (d,  $J = 14.9$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 6.64 (s, 1H, C(3)H), 7.22 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.30 (ddd,  $J = 8.5, 7.2, 1.4$  Hz, 1H), 7.43 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, Ts), 7.50 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.95 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, Ts), 8.05 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.8, 21.8, 26.4, 28.2 (3C), 32.5, 82.1,

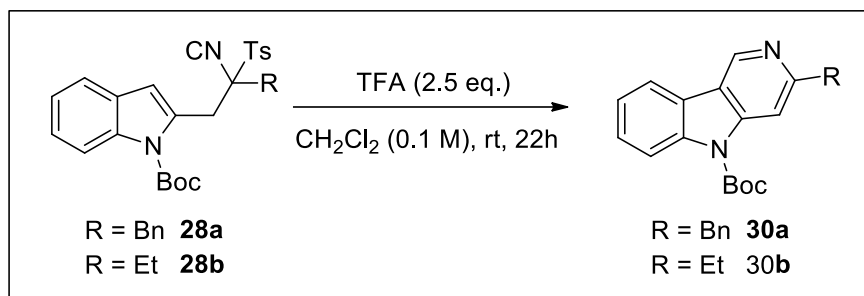


84.9, 112.4, 115.8, 120.6, 123.0, 124.5, 128.5, 129.9 (2C), 130.6, 131.4 (2C), 131.7, 136.8, 146.4, 150.6, 165.5 (N=C:). HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $C_{25}H_{29}N_2O_4S$   $[M+H]^+$ : 453.1843. Found 453.1855.

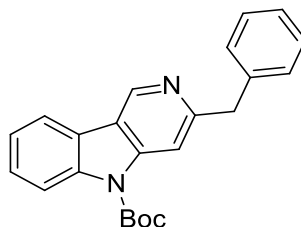
***tert*-Butyl pyrimido[1,6-*a*]indole-3-carboxylate (**20**)**



To a stirred solution of tosylmethylisocyanide (TosMIC, 195 mg, 1 mmol), 2-bromomethyl-1-(*tert*-butoxycarbonyl)indole (**18**, 403 mg, 1.3 mmol) and tetrabutylammonium iodide (TBAI, 74 mg, 0.2 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (2 mL), was added, at 0 °C, a solution of NaOH (40% in  $H_2O$ , 2 mL), and the solution was stirred vigorously at 0° C for 1 hour. Once the starting material was consumed, the reaction was warmed to room temperature, ethyl iodide (312 mg, 0.16 mL, 2 mmol) was added, and the reaction was stirred at room temperature for 24 hours. Then, water (5 mL) was added, and the two layers were separated. The aqueous layer was extracted with  $CH_2Cl_2$ . The combined organic layers were dried over anhydrous  $Na_2SO_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography (3:7 EtOAc/hexane) supplying compound **20** as a yellow oil (72 mg, 0.27 mmol, 27 %). IR (NaCl)  $\nu_{max}$   $cm^{-1}$ : 2975, 2932, 1713, 1531, 1456, 1368, 1246, 1137, 1089.  $^1H$ -NMR (500 MHz  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.64 (s, 9H, Boc), 7.41 (ddd,  $J = 8.2, 7.2, 1.2$  Hz, 1H), 7.46 (ddd,  $J = 7.9, 7.1, 1.0$  Hz, 1H), 7.81 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.99 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.09 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H), 9.19 (s, 1H).  $^{13}C$ -NMR (125 MHz  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) 28.3 (3C), 82.1, 97.7, 110.8, 117.3, 121.5, 123.0, 125.0, 128.8, 130.3, 133.1, 135.4, 138.4, 163.9. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $C_{16}H_{17}N_2O_2$   $[M+H]^+$ : 269.1285. Found 269.1311.

General procedure for the preparation of  $\gamma$ -carbolines **21a/b**

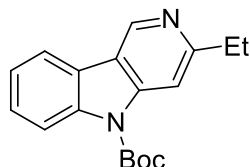
To a stirred solution of  $\alpha$ -(2-indolylmethyl) TosMIC derivative **19a/b** (0.19 mmol) in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL), under argon atmosphere, trifluoroacetic acid (54 mg, 35  $\mu\text{L}$ , 0.47 mmol) was added dropwise, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 22 h. Then, saturated aq.  $\text{NaHCO}_3$  solution (4 mL) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography to supply the corresponding  $\gamma$ -carboline.

*tert*-Butyl 3-benzyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole-5-carboxylate (**21a**)

The general procedure, starting from **19a** (100 mg, 0.19 mmol), after purification by silica gel column chromatography (3:7 EtOAc/hexane) supplied compound **21a** as a yellow oil (59 mg, 0.17 mmol, 87%). IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 2978, 2930, 1734, 1596, 1452, 1352, 1151, 987.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.65 (s, 9H, Boc), 4.34 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.21 – 7.25 (m, 1H), 7.30 – 7.36 (m, 4H), 7.39 (td,  $J = 7.5, 1.0$  Hz, 1H), 7.49 (ddd,  $J = 8.5, 7.3, 1.3$  Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 8.02 (dd,  $J = 7.8, 1.2$  Hz, 1H), 8.30 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 9.18 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 28.3 (3C), 45.3, 85.0, 110.3, 116.4, 119.9, 120.4, 123.7, 123.9, 126.6, 127.9, 128.8 (2C), 129.4 (2C), 138.8,

139.9, 141.7, 144.5, 150.6, 159.1. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $C_{23}H_{23}N_2O_2$   $[M+H]^+$ : 359.1754. Found 359.1747.

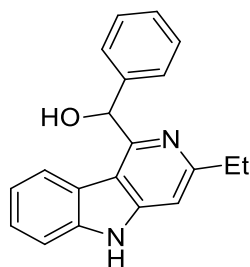
***tert*-Butyl 3-ethyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole-5-carboxylate (**21b**)**



The general procedure, starting from **19b** (80 mg, 0.19 mmol), after purification by silica gel column chromatography (3:7 EtOAc/hexane) supplied compound **21a** as an orange oil (29 mg, 0.10 mmol, 52%). IR (KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 2973, 2933, 1733, 1598, 1461, 1352, 1152.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.40 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.77 (s, 9H, Boc), 3.00 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 7.38 (td,  $J = 7.6$ , 1.0 Hz, 1H), 7.48 (ddd,  $J = 8.4$ , 7.3, 1.3 Hz, 1H), 8.01 (dd,  $J = 7.6$ , 1.3 Hz, 1H), 8.06 (s, 1H), 8.26 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 9.15 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 14.4, 28.4 (3C), 32.1, 85.0, 109.0, 116.4, 119.9, 120.1, 123.8, 123.9, 127.7, 138.6, 141.4, 144.7, 150.7, 161.6. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $C_{18}H_{21}N_2O_2$   $[M+H]^+$ : 297.1603. Found 297.1598.

**Preparation of  $\gamma$ -carbolines **22a/b**, **23a/b**, **24**, **25a-c** and **26****

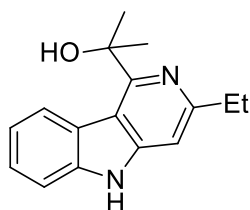
**(3-Ethyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indol-1-yl)(phenyl)methanol (**22a**)**



To a stirred solution of  $\alpha$ -(2-indolylmethyl) TosMIC derivative **19b** (140 mg, 0.31 mmol), and benzaldehyde (63 mg, 63  $\mu\text{L}$ , 0.62 mmol) in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 mL), at 0  $^\circ\text{C}$  and under argon atmosphere, was added dropwise during 5 min a solution of  $\text{AlEt}_2\text{Cl}$  (1M in hexane, 1.24 mmol, 1.24 mL) and the reaction mixture was stirred at the same

temperature for additional 15 min. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 18 h at the same temperature. Then, saturated aq.  $\text{NaHCO}_3$  solution (20 mL) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography (1:9 EtOAc/hexane), supplying pure compound **22a** as a white powder (52 mg, 0.17 mmol, 56%). Mp.: 198–200 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3250, 2964, 2933, 1607, 1459, 1325, 996.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.42 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.00 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 6.38 (s, 1H), 7.13–7.17 (m, 1H), 7.18–7.22 (m, 1H), 7.24–7.29 (m, 2H), 7.33–7.40 (m, 4H), 7.78 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 8.48 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 14.2, 31.4, 73.2, 103.2, 110.9, 114.7, 121.0, 122.9, 126.3, 126.8, 127.9, 128.0 (2C), 128.7 (2C), 139.4, 142.7, 145.8, 153.7, 157.4. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 303.1492. Found: 303.1493.

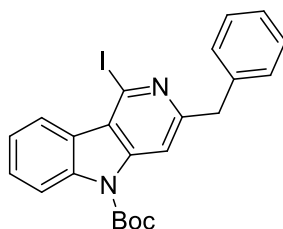
**2-(3-Ethyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indol-1-yl)propan-2-ol (22b)**



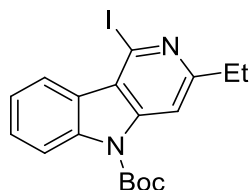
To a stirred solution of  $\alpha$ -(2-indolylmethyl) TosMIC derivative **19b** (98 mg, 0.22 mmol), and acetone (25 mg, 32  $\mu\text{L}$ , 0.43 mmol) in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL), at 0 °C and under argon atmosphere, was added dropwise during 5 min a solution of  $\text{AlEt}_2\text{Cl}$  (1M in hexane, 1.09 mmol, 1.09 mL) and the reaction mixture was stirred at the same temperature for additional 15 min. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 18 h at the same temperature. Then, saturated aq.  $\text{NaHCO}_3$  solution (4 mL) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography (2:8 EtOAc/hexane), supplying pure compound **22b** as a pale-orange powder (31 mg, 56%). Mp.: 202–204 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3196, 2965, 1610, 1460, 1402, 1325, 1183, 958.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.40 (t,

$J = 7.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.92 (s, 6H, 2  $\text{CH}_3$ ), 2.93 – 3.01 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 7.18 (s, 1H), 7.34 (ddd,  $J = 8.3, 6.8, 1.6$  Hz, 1H), 7.43 – 7.53 (m, 2H), 7.55 (bs, 1H), 8.25 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 8.91 (bs, 1H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 13.8, 28.0 (2C), 30.9, 71.1, 102.9, 111.0, 112.8, 120.5, 120.7, 124.4, 125.9, 139.5, 146.7, 155.8, 159.0. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 255.1492. Found: 255.1494.

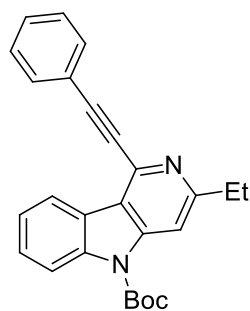
***tert*-Butyl 3-benzyl-1-iodo-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole-5-carboxylate (**23a**)**



A solution of  $\alpha$ -(2-indolylmethyl) TosMIC derivative **19a** (100 mg, 0.19 mmol), and *N*-iodosuccinimide (NIS, 87 mg, 0.39 mmol) in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL), under argon atmosphere was vigorously stirred at room temperature for 18 h. Then, water (5 mL) was added and the reaction mixture was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography (1:9 EtOAc/hexane), supplying pure compound **23a** as a yellow oil (86 mg, 93%). IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 2979 1742, 1587, 1528, 1386, 1321, 1150, 751.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.59 (s, 9H, Boc), 4.32 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.23 – 7.26 (m, 1H), 7.33 (br s, 2H), 7.34 (s, 2H), 7.45 – 7.49 (m, 1H), 7.56 (ddd,  $J = 8.5, 7.3, 1.3$  Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 8.36 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 8.93 (dd,  $J = 8.0, 1.3$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 28.3 (3C), 44.8, 85.6, 109.8, 110.0, 116.0, 120.9, 123.2, 123.5, 126.8, 128.6, 128.8, 128.9 (2C), 129.6 (2C), 139.1, 139.2, 144.6, 150.0, 160.0. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{IN}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 485.0720. Found: 485.0720.

***tert*-Butyl 3-ethyl-1-iodo-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole-5-carboxylate (**33b**)**

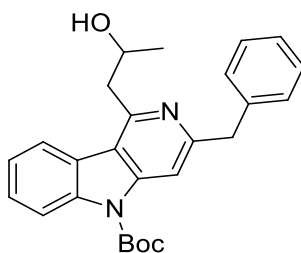
A solution of  $\alpha$ -(2-indolylmethyl) TosMIC derivative **19b** (93 mg, 0.20 mmol), and *N*-iodosuccinimide (NIS, 93 mg, 0.41 mmol) in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL), under argon atmosphere was vigorously stirred at room temperature for 18 h. Then, water (5 mL) was added and the reaction mixture was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography (3:7 EtOAc/hexane), supplying pure compound **23b** as a white powder (61 mg, 70%). Mp.: 113–115 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 2979, 2967, 1744, 1638, 1591, 1460, 1388, 1320, 1150, 744.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.38 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.77 (s, 9H, Boc), 2.97 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.43 – 7.49 (m, 1H), 7.56 (ddd,  $J$  = 8.5, 7.3, 1.3 Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.31 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 8.93 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 14.3, 28.4 (3C), 31.7, 85.5, 108.5, 109.9, 116.0, 120.9, 123.0, 123.2, 123.7, 128.4, 138.8, 145.0, 150.2, 162.4. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{IN}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 423.0564. Found: 423.0570.

***tert*-Butyl 3-ethyl-1-(phenylethynyl)-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole-5-carboxylate (**24**)**

To a mixture of iodinated  $\gamma$ -carboline **23b** (76 mg, 0.18 mmol),  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$  (6 mg, 0.01 mmol) and  $\text{CuI}$  (4 mg, 0.02 mmol), in dry THF (3 mL),  $i\text{-Pr}_2\text{NH}$  (1 mL) was

added. The resulting mixture was stirred at room temperature for 24 h. The reaction was quenched by addition of saturated aq.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution (6 mL). After separation, the aqueous layer was extracted with  $\text{Et}_2\text{O}$ , and the combined organic layers were dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography (5:95  $\text{EtOAc}$ /hexane), supplying pure compound **24** quantitatively as a brown oil (72 mg, 100%). IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 2974, 2933, 2214, 1734, 1589, 1397, 1314, 1154.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.43 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.78 (s, 9H, Boc), 3.02–3.06 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.41–7.46 (m, 4H), 7.52 (ddd,  $J = 8.5, 7.3, 1.3$  Hz, 1H), 7.75–7.78 (m, 2H), 8.10 (s, 1H), 8.29 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.67 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 14.6, 28.4 (3C), 32.3, 85.2, 88.5, 93.4, 108.7, 116.0, 121.0, 121.9, 122.6, 123.7, 123.9, 128.0, 128.6 (2C), 129.2, 132.2 (2C), 135.4, 138.8, 145.0, 150.6, 161.9. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 397.1911. Found: 397.1907.

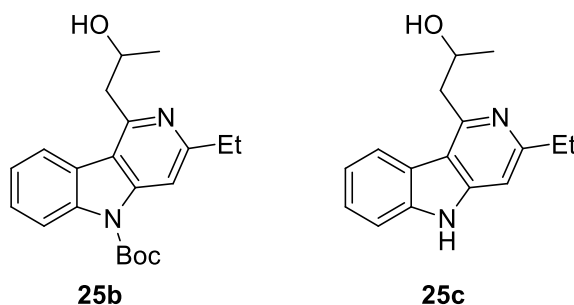
***tert*-Butyl 3-benzyl-1-(2-hydroxypropyl)-5H-pyrido[4,3-*b*]indole-5-carboxylate (25a)**



To a stirred solution of  $\alpha$ -(2-indolylmethyl) TosMIC derivative **19a** (20 mg, 0.037 mmol), and propylene oxide (9 mg, 10  $\mu\text{L}$ , 0.15 mmol) in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 mL), at 0  $^\circ\text{C}$  and under argon atmosphere, was added dropwise during 5 min a solution of  $\text{AlEt}_2\text{Cl}$  (1M in hexane, 0.15 mmol, 0.15 mL) and the reaction mixture was stirred at the same temperature for additional 15 min. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 24 h at the same temperature. Then, saturated aq.  $\text{NaHCO}_3$  solution (2 mL) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography (3:7  $\text{EtOAc}$ /hexane), supplying pure compound **25a** as a colorless oil (8 mg, 0.019 mmol, 50%). IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3401, 2970, 2927,

1733, 1589, 1442, 1371, 1155.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.45 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.69 (s, 9H, Boc), 3.45–3.54 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 4.30 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.52–4.63 (m, 1H,  $\text{CHOH}$ ), 7.28 (s, 1H), 7.33–7.36 (m, 4H), 7.43 (td,  $J = 7.5, 1.0$  Hz, 1H), 7.52 (td,  $J = 7.8, 1.0$  Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 8.05 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 8.38 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 23.1, 28.4 (3C), 43.0, 45.3, 65.9, 85.2, 108.3, 110.9, 116.3, 118.0, 122.1, 123.9, 124.1, 127.3, 128.8 (2C), 129.4 (2C), 138.8, 139.8, 145.0, 150.6, 154.7, 157.4. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 417.2175. Found: 417.2173.

***tert*-Butyl 3-ethyl-1-(2-hydroxypropyl)-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole-5-carboxylate (25b) and 1-(3-Ethyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indol-1-yl)propan-2-ol (25c)**



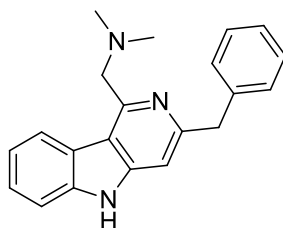
To a stirred solution of  $\alpha$ -(2-indolylmethyl) TosMIC derivative **19b** (130 mg, 0.29 mmol), and propylene oxide (67 mg, 80  $\mu\text{L}$ , 1.15 mmol) in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 mL), at 0  $^\circ\text{C}$  and under argon atmosphere, was added dropwise during 5 min a solution of  $\text{AlEt}_2\text{Cl}$  (1M in hexane, 1.7 mmol, 1.7 mL) and the reaction mixture was stirred at the same temperature for additional 15 min. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 24 h at the same temperature. Then, saturated aq.  $\text{NaHCO}_3$  solution (4 mL) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography (gradient: 3:7 EtOAc/hexane to 1/9 MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), supplying pure compound **25b** as a brown oil (23 mg, 0.064 mmol, 22%) and compound **25c** as a white solid (34 mg, 0.13 mmol, 46%).



**25b:** IR (NaCl)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3370, 2973, 2932, 1734, 1592, 1460, 1408, 1370, 1155.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.39 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.44 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.77 (s, 9H, Boc), 2.97 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.22–3.29 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 3.44–3.53 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 4.52–4.61 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ), 7.41 (td,  $J = 7.6, 1.0$  Hz, 1H), 7.50 (ddd,  $J = 8.5, 7.4, 1.2$  Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 8.03 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 8.33 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 14.1, 23.1, 28.4 (3C), 31.7, 42.7, 66.1, 85.2, 107.3, 116.3, 117.8, 122.1, 123.9, 124.3, 127.2, 138.6, 145.2, 150.7, 154.4, 159.7. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 355.2020. Found: 355.2016.

**25c:** Mp.: 150–152 °C. IR (NaCl)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3252, 2970, 1609, 1456, 1262, 1120, 741.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm): 1.33 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.39 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2.98 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.50 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 4.31–4.43 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ), 7.32–7.39 (m, 2H), 7.49–7.60 (m, 2H), 8.18 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) 14.6, 23.4, 30.1, 44.1, 67.9, 104.2, 112.8, 118.0, 122.4, 123.5, 128.3, 142.1, 148.2, 152.8, 156.3. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 255.1492. Found: 255.1492.

**1-(3-Benzyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indol-1-yl)-*N,N*-dimethylmethanamine (26)**

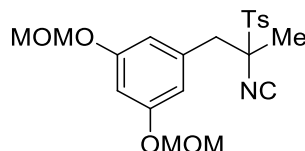


To a stirred solution of  $\alpha$ -(2-indolylmethyl) TosMIC derivative **19a** (50 mg, 0.09 mmol), and dimethylmethylenediammonium iodide (Eschenmoser's salt, 35 mg, 0.19 mmol) in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 mL), at 0 °C and under argon atmosphere, was added dropwise during 5 min a solution of  $\text{AlEt}_2\text{Cl}$  (1M in hexane, 0.38 mmol, 0.38 mL) and the reaction mixture was stirred at the same temperature for additional 15 min. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 24 h at the same temperature. Then, saturated aq.  $\text{NaHCO}_3$  solution (2 mL) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The

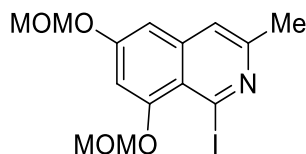
crude product was purified by silica gel column chromatography (gradient: 5:95 to 1:9 MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), supplying pure compound **26** as a white solid (24 mg, 0.075 mmol, 80%). Mp.: 138–140 °C. IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>: 3420, 3058, 2945, 1603, 1453, 1327, 1264, 850, 736. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 2.50 (s, 6H, 2 CH<sub>3</sub>), 4.11 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.22 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.09 (s, 1H), 7.13–7.17 (m, 1H), 7.18–7.24 (m, 5H), 7.35 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 7.52 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 7.89 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 42.8, 45.4 (2C), 61.1, 105.3, 112.0, 116.6, 120.6, 121.3, 122.9, 126.8, 127.1, 128.8 (2C), 129.3 (2C), 138.8, 140.4, 146.2, 148.2, 152.7. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 316.1813. Found: 316.1808.

### Part III. Cassiarin A

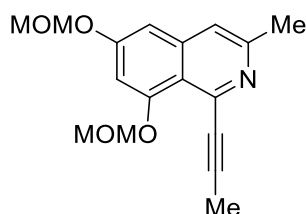
#### 1-[2-Isocyano-2-[(4-methylphenyl)sulfonyl]propyl]-3,5-bis(methoxymethoxy)benzene (**29**)



To a stirred solution of 1-bromomethyl-3,5-bis(methoxymethoxy)benzene **28**<sup>277</sup> (291 mg, 1 mmol), tosylmethylisocyanide (TosMIC, 195 mg, 1 mmol) and tetrabutylammonium iodide (TBAI, 74 mg, 0.2 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3.5 mL), was added, at 0 °C, a solution of NaOH (40% in H<sub>2</sub>O, 3.5 mL), and the reaction mixture was vigorously stirred at the same temperature for 1h. Then, the reaction mixture was warmed to room temperature and methyl iodide (852 mg, 0.37 mL, 6 mmol) was added. Stirring was maintained at the same temperature for 18 h and then, water (7 mL) was added, and the two layers were separated. The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic layers were dried with anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure to give a crude product. The crude product was purified by flash chromatography [silica gel, hexane/EtOAc (8:2)], supplying pure compound **29** as a white solid (298 mg, 0.71 mmol, 71%). Mp.: 103–105 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>: 2963, 2902, 2124, 1592, 1471, 1324, 1146, 1051, 1019. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 1.51 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.12 (br d, *J* = 3.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.40 (s, 6H, 2 OCH<sub>3</sub>), 5.06 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 5.11 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 6.56 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 6.66 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, C(3,5 arom)H), 7.87 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, C(2,6 arom)H). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 20.0, 21.6, 39.1, 55.9 (2C), 78.5, 94.2 (2C), 104.2, 118.9 (2C), 128.9, 129.7 (2C), 131.1 (2C), 133.9, 146.4, 158.0 (2C), 164.8 (N=C:). HRMS (ESI-TOF) *m/z* calculated for C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>6</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 420.1474. Found 420.1456.

**1-Iodo-6,8-bis(methoxymethoxy)-3-methyl-isoquinoline (30)**

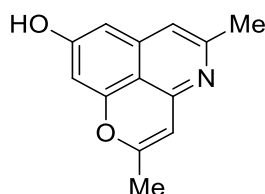
A solution of  $\alpha$ -benzyl TosMIC derivative **29** (419 mg, 1 mmol), and *N*-iodosuccinimide (450 mg, 2 mmol) in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL), under argon atmosphere, was vigorously stirred at room temperature for 22 h. Then, tetrabutylammonium iodide (TBAI, 74 mg, 0.2 mmol) and aq. NaOH solution (40% in  $\text{H}_2\text{O}$ , 33 mL) were added and the reaction mixture was vigorously stirred at the same temperature for 5 h. Water (250 mL) was added and the two layers were separated. The aqueous layer was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , and combined organic layers were dried with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography [silica gel, hexane/EtOAc (9:1)] supplying pure compound **30** as a colorless oil (334 mg, 0.86 mmol, 86%). IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 2957, 2828, 1621, 1558, 1470, 1374, 1276, 1151, 835.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.54 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.47 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.57 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 5.23 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 5.33 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 6.80 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 6.85 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 7.17 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 23.5, 56.4, 56.9, 93.8, 94.2, 101.8, 103.2, 112.2, 117.2, 118.4, 140.5, 152.7, 153.3, 158.6. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{INO}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 390.0197. Found 390.0179.

**6,8-Bis(methoxymethoxy)-3-methyl-1-prop-1-ynyl-isoquinoline (31)**

*cis*-1-Bromo-1-propene (145 mg, 0.10 mL, 1.2 mmol) was dissolved in dry THF (2 mL) under argon atmosphere. After cooling to  $-78^\circ\text{C}$ , to the solution was added *n*-BuLi (1.63 M in hexane, 1 mL, 1.63 mmol). The resulting mixture was stirred at  $-78^\circ\text{C}$  for 1 h. Water (0.03 mL) was added, and the temperature was allowed to rise to  $0^\circ\text{C}$  where the mixture was stirred for additional 30 min. To the mixture was added a solution of

iodide **30** (78 mg, 0.2 mmol) in THF (1.4 mL), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mg, 0.01 mmol), CuI (4 mg, 0.02 mmol), and *i*-Pr<sub>2</sub>NH (1 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for 24 h. The reaction was quenched by addition of saturated aq NH<sub>4</sub>Cl solution (6 mL). After separation, the organic layer was extracted with Et<sub>2</sub>O, and the combined organic layers were dried Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography [silica gel, hexane/EtOAc (6:4)] supplying pure compound **31**<sup>272</sup> as a white solid (52.3 mg, 0.17 mmol, 87%). Mp.: 104–106 °C (Lit. 105–106 °C). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 2.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.56 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.47 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.56 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 5.22 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 5.30 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 6.71 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.20 (s, 1H).

**Cassiarin A (2,5-dimethyl-pyrano[2,3,4-*ij*]isoquinolin-8-ol) (**32**)**<sup>272</sup>



To a solution of alkyne **31** (106 mg (0.35 mmol) in MeOH (7 mL) was added an aq. HCl solution (10% in H<sub>2</sub>O, 2.5 mL) and the resulting mixture was stirred at room temperature for 30 h. Solvents were evaporated to give a yellow solid residue. To the residue were added an aq ammonia solution (10% in H<sub>2</sub>O, 18 mL) and a solution of 5 mL of CHCl<sub>3</sub>/MeOH ((4:1), 5 mL) and then the resulting mixture was vigorously stirred for 1 h. After evaporation of the solvents, the residue was extracted with CHCl<sub>3</sub>/MeOH (4:1). The extract was purified by column chromatography [silica gel, CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9:1)] to give 74.5 mg (100%) of **Cassiarin A (32)**<sup>272</sup> as a yellow solid. Mp. >240 °C (decomp) (Lit. >240 °C (decomp))<sup>272</sup>. Spectral data for **32** are identical to those of the isolated natural product.<sup>271</sup> <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz (1:1) CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 2.28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.16 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 6.84 (s, 1H).



## 6. Conclusions



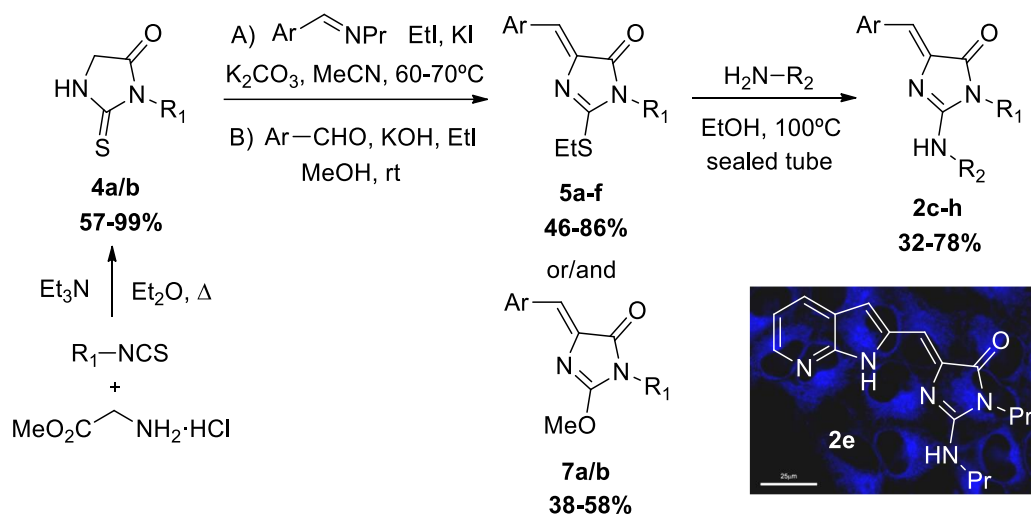




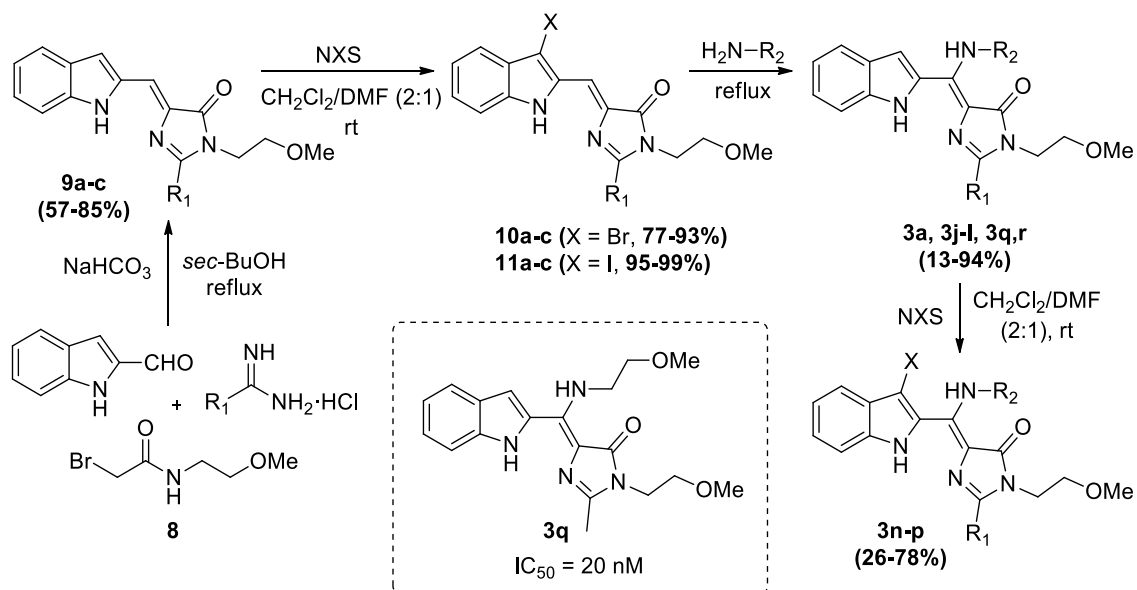
The research work presented in this doctoral thesis is framed in a wider research program in the group, derived from previous investigations in the chemistry of TosMIC and the discovery of new indolylmethyleimidazolones with calpain inhibition or fluorescent properties.

Although specific conclusions are presented at the end of each chapter, a summary of the main conclusions are displayed below.

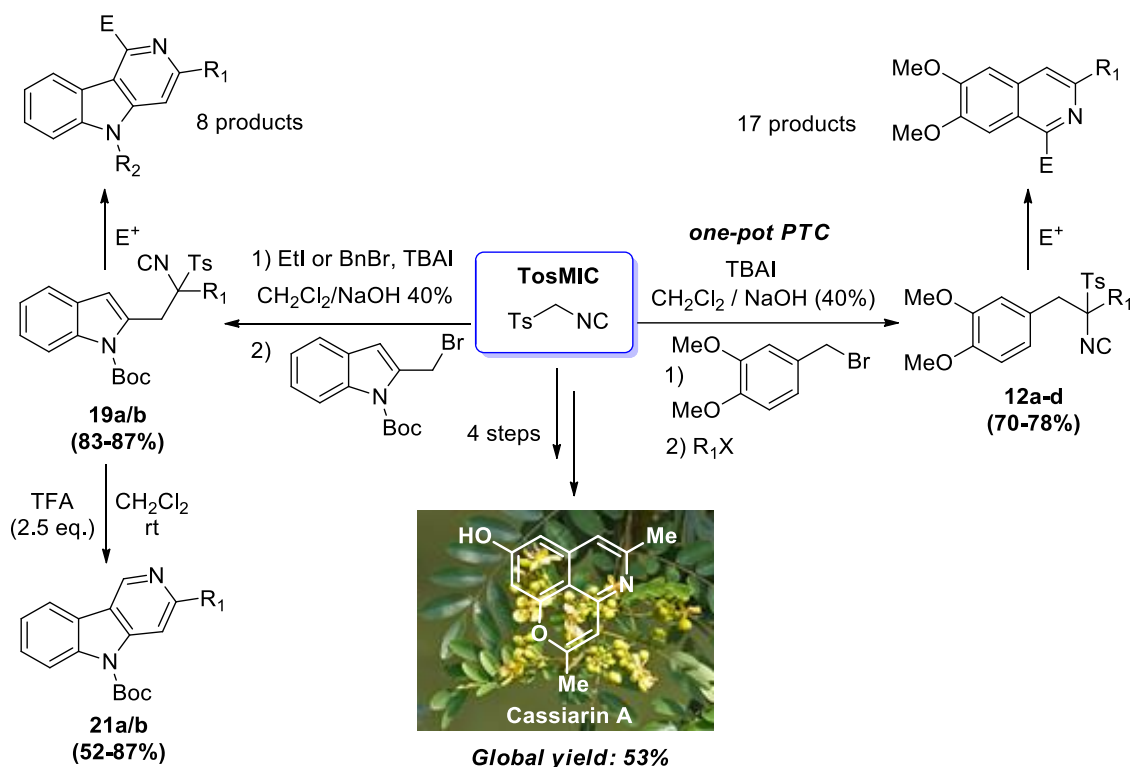
- **[Chapter 2].** A new synthetic route for the preparation of a family of GFP-chromophore analogues was designed and developed, leading to the desired compounds in a straightforward manner and high yields. The compounds synthesized have been subjected to a photophysical study, which has pointed remarkable characteristics for some of the analogues. Compound **2c** exhibits significantly enhanced fluorescence properties than its parent *p*-HBDI, with a quantum yield two orders of magnitude higher, while compound **2e** has  $\Phi_F = 44.9\%$  in chloroform. Moreover, a confocal microscopy analysis on live HeLa cells showed that compound **2e** has very promising properties as a cell-permeant, live-cell fluorescent stain with high selectivity for the endoplasmic reticulum. In this sense, the live-cell permeation, small size, and compact nature of the core chromophore opens the possibility of further derivatizations that may target other subcellular structures.



- **[Chapter 3].** A new methodology for the synthesis of a series of non-peptidic calpain inhibitors was developed. This new pathway involves a multicomponent reaction, subsequent halogenation and an aza-Michael reaction with concomitant elimination of the halogen. This short and efficient route has allowed the preparation of a small family of compounds that have been tested as calpain inhibitors. Compound **3j** showed slightly enhanced inhibition in comparison with the *hit* **3a** ( $IC_{50}$  (**3a**) = 0.46  $\mu$ M; (**3j**) = 0.35  $\mu$ M). Moreover, the substitution on imidazolone C2 seems to be crucial for inhibition: while a phenyl group in this position causes a drastic loss of inhibition (**3r**,  $IC_{50}$  > 1  $\mu$ M), the presence of a methyl group is related to a significant increase of inhibitory activity (**3q**,  $IC_{50}$  = 0.02  $\mu$ M). The inhibition is consistent with an uncompetitive inhibition mode. Moreover, compound **3a** was capable of blocking *chemical ischemia* induction of apoptosis in intact human kidney tubular epithelial cells by preventing sodium azide-dependent calpain activation. At none of the doses tested (0.1–10  $\mu$ M) inhibitor **3a** showed cellular toxicity.



- **[Chapter 4].** A new methodology for the synthesis of 1,3-disubstituted isoquinolines and  $\gamma$ -carbolines was developed. The main step is a heterocyclization that involves TosMIC derivatives and acids or electrophiles. This method takes advantage of the ability of isocyanides to act both as nucleophiles and electrophiles and works efficiently when electron-donating substituents are present in the benzene ring in the case of isoquinolines. For the preparation of  $\gamma$ -carbolines the indole is sufficiently electron-rich to achieve the cyclization. Following this methodology, 17 isoquinolines and 10  $\gamma$ -carbolines have been synthesized in high yields in most of the cases. Furthermore, the validity of this methodology was demonstrated by applying it to a total synthesis of the alkaloid Cassiarin A.





## **7. Annex: work performed at The Scripps Research Institute**

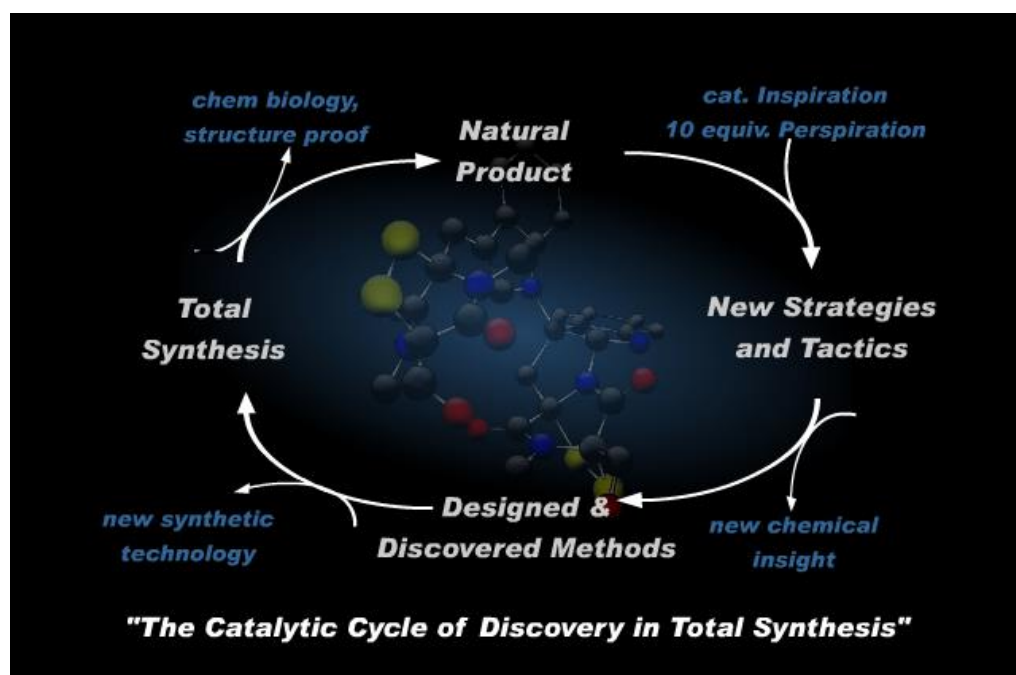




## 7.1. INTRODUCTION

In 2015, I spent a three-month stay funded by the University of Alcalá (Mobility Grant for Researchers) as a visiting researcher at Prof. Phil Baran's group at The Scripps Research Institute in San Diego, California, with the aim of improving my postgraduate training.

Prof. Baran's group research is focused on the total synthesis of natural products in an efficient and chemoselective way. His approach takes special care at the principle of atom economy to achieve molecular complexity and avoids unnecessary protection-deprotection steps when possible. The challenges that appear in the course of a total synthesis often serve as inspiration for the design and development of new reactions and strategies. This cycle is depicted in **Figure A1**.



**Figure A1.** "The cycle of discovery in total synthesis" (Image taken from the Prof. Baran Laboratory website <https://www.scripps.edu/baran/html/home.html>).

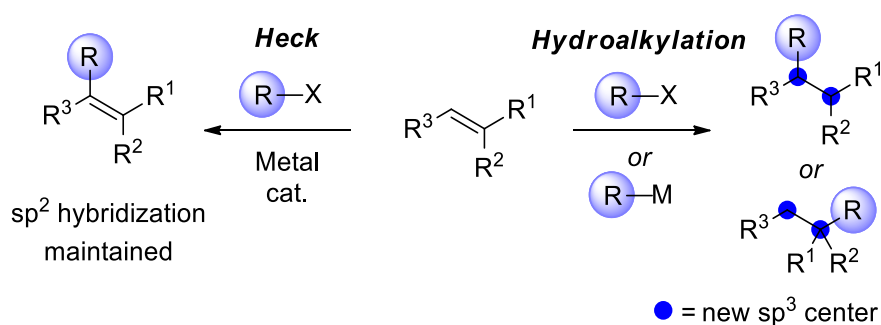
Lately, the group has made great improvements on both electrochemical and metal-catalyzed reactions using nickel or iron, leading to the formation of C–C, C–H

and C–heteroatom bonds. These new strategies for the formation of C–X bonds have been successfully applied to the synthesis of natural products such as Pallambins C and E, Taxanes or (+)-Phorbol. During my internship, I worked on a project related to the iron-catalyzed hydroethylation of unactivated olefins *via* radicals.

## 7.2. GROUP BACKGROUND

Olefins represent abundant and easily accessible starting materials with a wide range of applications in different fields such as petrochemistry or medicine. They are useful functional groups due to their inertness, and their chemical transformations have been well-studied. An example is the Heck reaction,<sup>278</sup> which has proved to be extremely useful for the formation of  $sp^2$  C–C bonds.

A complementary transformation to the Heck reaction is the hydroalkylation, a process that formally involves the addition of a hydrogen and a carbon across an olefin double bond, generating two  $sp^3$  centers from the starting alkene.



**Scheme A1.** Hydroalkylation vs Heck reaction.

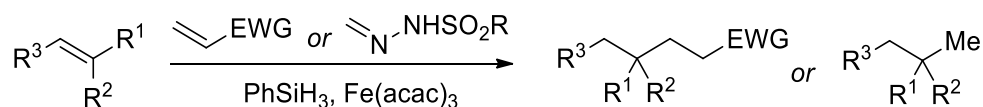
In this context, Prof. Baran's group has recently developed a series of robust hydroalkylation methods initiated by hydrogen atom transfer (HAT) to unactivated olefins.<sup>279</sup> Among them, couplings with activated olefins, cyclizations, and most

<sup>278</sup> Heck, R. F.; Nolley, Jr.; J. P. *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 2320 – 2322.

<sup>279</sup> (a) Lo, J. C.; Gui, J.; Yabe, Y.; Pan, C.-M.; Baran, P. S. *Nature* **2014**, 516, 342 – 348. (b) Gui, J.; Pan, C.-M.; Jin, Y.; Qin, T.; Lo, J. C.; Lee, B. J.; Spengel, S. H.; Mertzman, M. E.; Pitts, W. J.; La Cruz, T. E.; Schmidt, M. A.; Darvatkar, N.; Natarajan, S. R.; Baran, P. S. *Science* **2015**, 348, 886 – 891. (c) Dao, H. T.; Li, C.; Michaudel, Q.; Maxwell, B. D.; Baran, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 804 – 8049.



recently, formal hydromethylation, could be highlighted. All of them use inexpensive iron catalysis and readily available reagents.

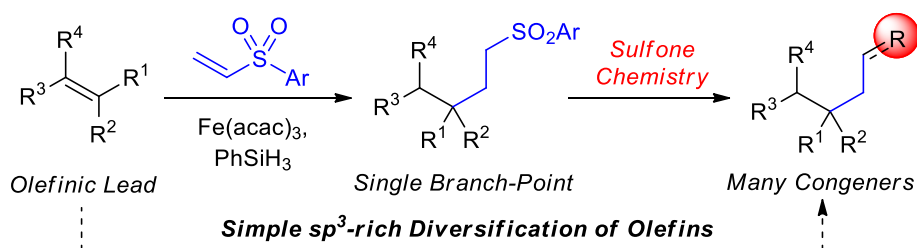


**Scheme A2.** Hydroalkylation background in Baran's group.

The project I worked on is an extension to this series of methods that provides a convenient platform for late-stage diversification of olefin-containing compounds.

### Iron-catalyzed hydroalkylation of unactivated olefins

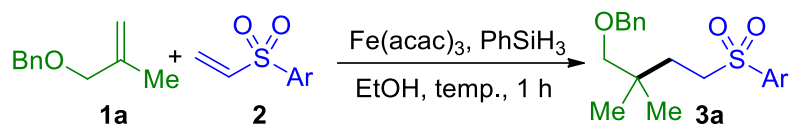
The project started with the aim of extending the recently reported olefin hydromethylation method<sup>279a</sup> to hydroethylation. As vinyl sulfones have a rich history as ethylene equivalents,<sup>280</sup> the possibility of using them as an acceptor olefin in the iron-catalyzed coupling was investigated. Taking advantage of the versatility associated with sulfones, we could also generate additional structural diversity beyond hydroethylation.



**Scheme A3.** Proposed olefin diversification *via* hydroalkylation.

The reaction conditions were optimized using olefin **1a** and phenyl vinyl sulfone **2a**, beginning with conditions similar to those previously developed in the group.<sup>279</sup>

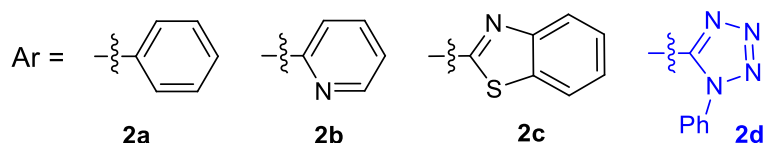
<sup>280</sup> (a) Carr, R. V. C.; Paquette, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 853 – 855. (b) Carr, R. V. C.; Williams, R. V.; Paquette, L. A. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4976 – 4986. (c) Simpkins, N. S. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 6951 – 6984. (d) Forristal, I. *J. Sulfur Chem.* **2005**, *26*, 163 – 195.

**Table A1.** Optimization of reductive coupling with vinyl sulfones.

Entry	Sulfone (equiv.)	$\text{Fe}(\text{acac})_3$ (mol %)	$\text{PhSiH}_3$ (equiv.)	Temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )	Yield (%) <sup>b</sup>
1	2a (3.0)	30	2.0	60	24
2	2a (2.0)	30	2.0	60	27
3	2a (1.5)	30	2.0	60	53
4	2a (1.5)	100	2.0	60	50
5	2a (1.5)	15	2.0	60	29
6	2a (1.5)	30	2.5	60	46
7	2a (1.5)	30	1.5	60	57
8	2b (1.5)	30	1.5	60	69
9	2c (3.0)	30	1.5	60	72
10	2d (3.0)	30	1.5	60	74
11	2d (3.0)	30	1.5	23	0
12	2d (3.0)	30	1.5	40	24
13	2d (3.0)	30	1.5	80	64

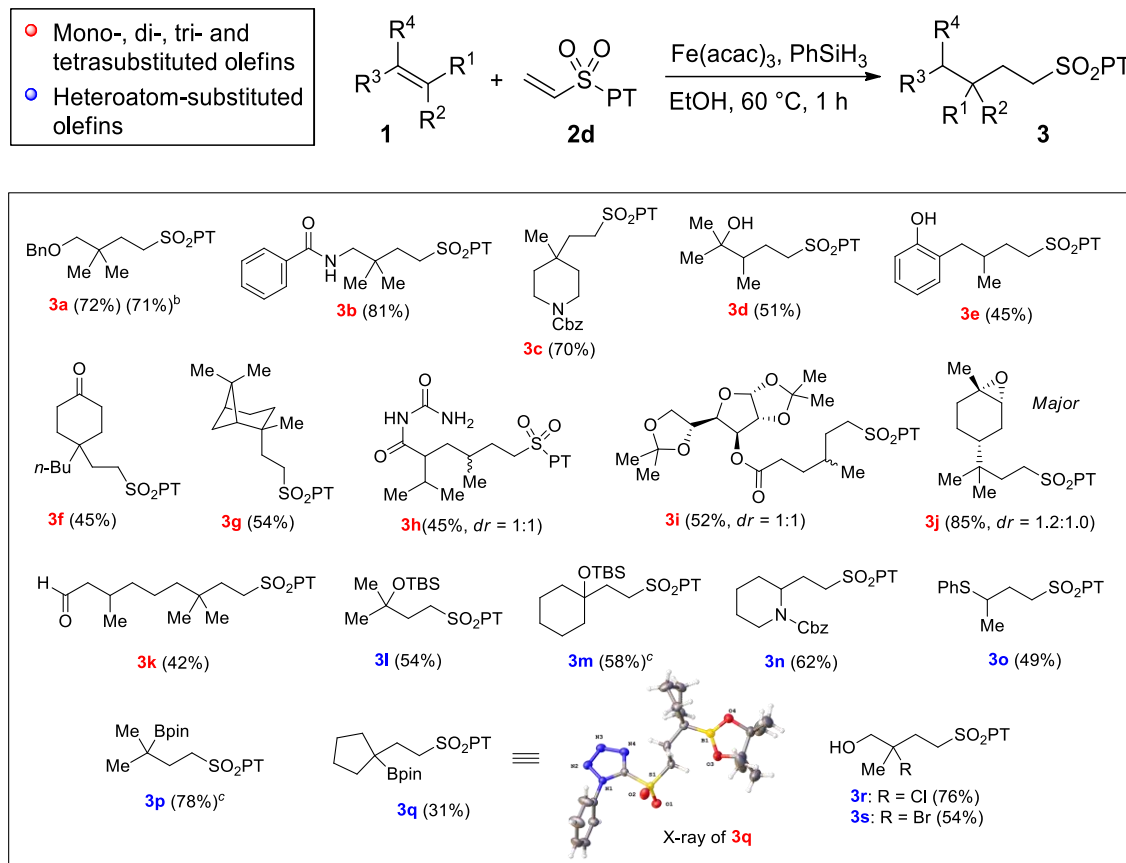
<sup>a</sup>All reactions were performed on 0.1 mmol scale and 0.2 M concentration in a sealed vial under air. <sup>b</sup>Yields determined by  $^1\text{H}$ -NMR with 1,3,5-trimethoxybenzene as internal standard.

## Sulfone structures:



Systematic variation of the relative amounts of reagents and catalyst (entries 1-7) showed that 1.5 equivalents of both silane and vinyl sulfone, and 30 mol% of  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  were optimal, delivering coupling product **3a** in an improved 57% yield (entry 7). Unfortunately, the coupling with phenyl sulfone **2a** resisted further optimization, and turned out to be limited in scope when additional olefin substrates were explored. The structure of the aryl ring attached to the sulfone was also probed, switching to more electron-deficient heteroaryl vinyl sulfones (**2b-d**). The *N*-phenyl tetrazole (PT) sulfone **2d** provided the highest yield at 74% (entry 10). Temperatures either lower (entries 11 and 12) or higher (entry 13) than 60 °C resulted in lower yields, and thus, the system shown in entry 10 represented the optimized conditions.

Exploring the scope of the iron-catalyzed hydroalkylation with the PT vinyl sulfone **2d** (Table A2), it was found that the reaction proved rather general, proceeding effectively with a range of olefins, including mono-, di-, tri- and tetrasubstituted variants (**3a-3k**). The mild conditions tolerated a variety of functional groups, including a free alcohol (**3d**) and phenol (**3e**), a protected amine (**3c**) and an amide (**3b**), as well as ketals and acetals (**3i**), and groups potentially sensitive to hydrosilylation such as ketones (**3f**) and aldehydes (**3k**), along with an epoxide (**3j**), appeared to be largely unaffected on the time-scale of the reaction. Overall, the yields of the sulfone adducts ranged between 42% to 85%, and the reaction could be conducted on gram-scale with comparable efficiency (**3a**). Heteroatom substituted olefins such as silyl enol ethers (**3l**, **3m**), enecarbamates (**3n**), and vinyl sulfides (**3o**), boronates (**3p**, **3q**) and halides (**3r**, **3s**) all performed effectively in the chemistry (31-78%).

**Table A2.** Scope of the alkyl-substituted and heteroatom-substituted donor olefins used in the vinyl sulfone coupling.

<sup>a</sup>Fe(acac)<sub>3</sub> (30 mol%), PhSiH<sub>3</sub> (1.5 equiv.), EtOH (0.2 M), 60 °C, 1 h. <sup>b</sup>Yield for gram-scale experiment. <sup>c</sup>PhSiH<sub>3</sub> (3.0 equiv.), 2d (3.0 equiv.).



**Generation of the iron hydride complex  $H\cdot Fe(acac)_2$  (VIII).** Solvolysis of the  $Fe(acac)_3$  precatalyst with EtOH generates a bridged dimeric Fe species **I** that reacts with  $PhSiH_3$  to give the dihydride **II**. It spontaneously loses  $H_2$  to give  $Fe(acac)_2$ , which is presumably oxidized to catalytically active  $Fe(acac)_3$  by the  $O_2$  present in air.  $Fe(acac)_2$  catalyzes the reaction of  $PhSiH_3$  with EtOH to provide the active reductant  $PhSiH_2(OEt)$  **III** that, through a transmetalation, converts **I** to the bridged monohydride **VI**, which fragments to give Fe ethoxide **VII** and Fe hydride **VIII**.

**Coupling of the donor and acceptor olefins.** The main step of the proposed mechanism involves the transfer of a hydrogen atom from Fe hydride **VIII** to the donor olefin, giving the intermediate alkyl radical **X**. Then, a Giese-type radical conjugate addition<sup>283,284</sup> of alkyl radical **X** into the electron deficient acceptor olefin to form radical adduct **XI** takes place. Single electron reduction of the radical by  $Fe(acac)_2$  gives the stabilized carbanion **XIII** with concomitant reoxidation of iron(II) **IX** to iron(III) **XII**. This stabilized anion **XIII** can be protonated with EtOH to provide the coupled adduct along with the iron(III) ethoxide **VII**, which dimerizes to reform  $[Fe(acac)_2(OEt)]_2$  **I**.

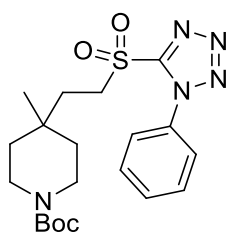
This way, building on the findings of Mukaiyama and others in this area,<sup>282</sup> simple Fe-based catalysts and an inexpensive silane are employed for the generation of radicals from electron-neutral or rich olefins. Their subsequent capture with the PT vinyl sulfone provides hydroalkylation products that can be straightforward derivatized.

<sup>283</sup> Porter, N. A.; Giese, B.; Curran, D. P. *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 296 – 304.

<sup>284</sup> Srikanth, G. S. C.; Castle, S. L. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10377 – 10441.

### 7.3. DISCUSSION: Diversification of a lead compound to generate additional molecular complexity

Having established that coupling with PT vinyl sulfone **2d** was viable with a wide array of olefins, the next goal was to demonstrate that the PT sulfone adducts could serve as a versatile branch-point for the diversification of a given lead compound. I joined the project at this point, so my objective was to carry out the diversification of a lead compound. We selected as branch point adduct a compound containing a 4,4-disubstituted piperidine motif, a privileged scaffold appearing in a number of approved drugs and bioactive compounds.<sup>285</sup>

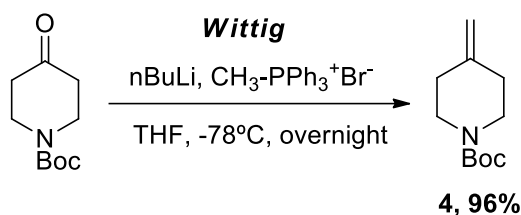
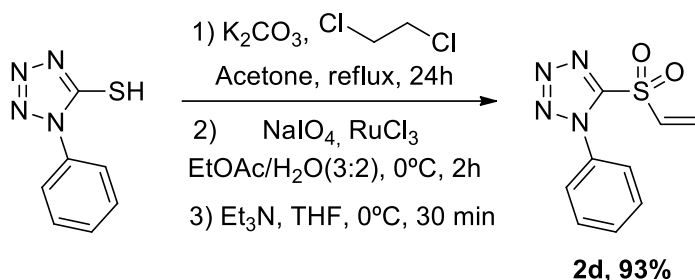


**Figure A1.** Compound designed as branch point for the diversification.

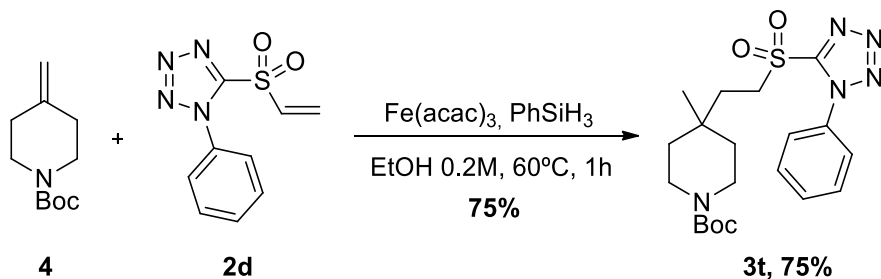
The alkene **4** was synthesized from 1-Boc-4-piperidone *via* a Wittig reaction, and the PT vinyl sulfone **2d** was prepared following the procedure described by M<sup>a</sup> Belén Cid and coworkers<sup>286</sup> with slight modifications (**Scheme A4**).

<sup>285</sup> (a) Bollinger, S.; Huebner, H.; Heinemann, F. W.; Meyer, K.; Gmeiner, P. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7167 – 7179. (b) Kazmierski, W. M.; Anderson, D. L.; Aquino, C.; Chauder, B. A.; Duan, M.; Ferris, R.; Kenakin, T.; Koble, C. S.; Lang, D. G.; McIntyre, M. S.; Peckham, J.; Watson, C.; Wheelan, P.; Spaltenstein, A.; Wire, M. B.; Svolto, A.; Youngman, M. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3756 – 3767. (c) Close, J.; Heidebrecht, R.; Hendrix, J.; Li, C.; Munoz, B.; Surdi, L.; Kattar, S.; Tempest, P.; Moses, P.; Geng, X.; Hughes, B.; Smotrov, N.; Moxham, C.; Chapnick, J.; Kariv, I.; Nikov, G.; Burke, J. E.; Deshmukh, S.; Jeliaskova-Mecheva, V.; Leach, J. K.; Diaz, D. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 3203 – 3207.

<sup>286</sup> Rodrigo, E.; Morales, S.; Duce, S.; García Ruano, J. L.; Cid, M. B. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 11267 – 11269.

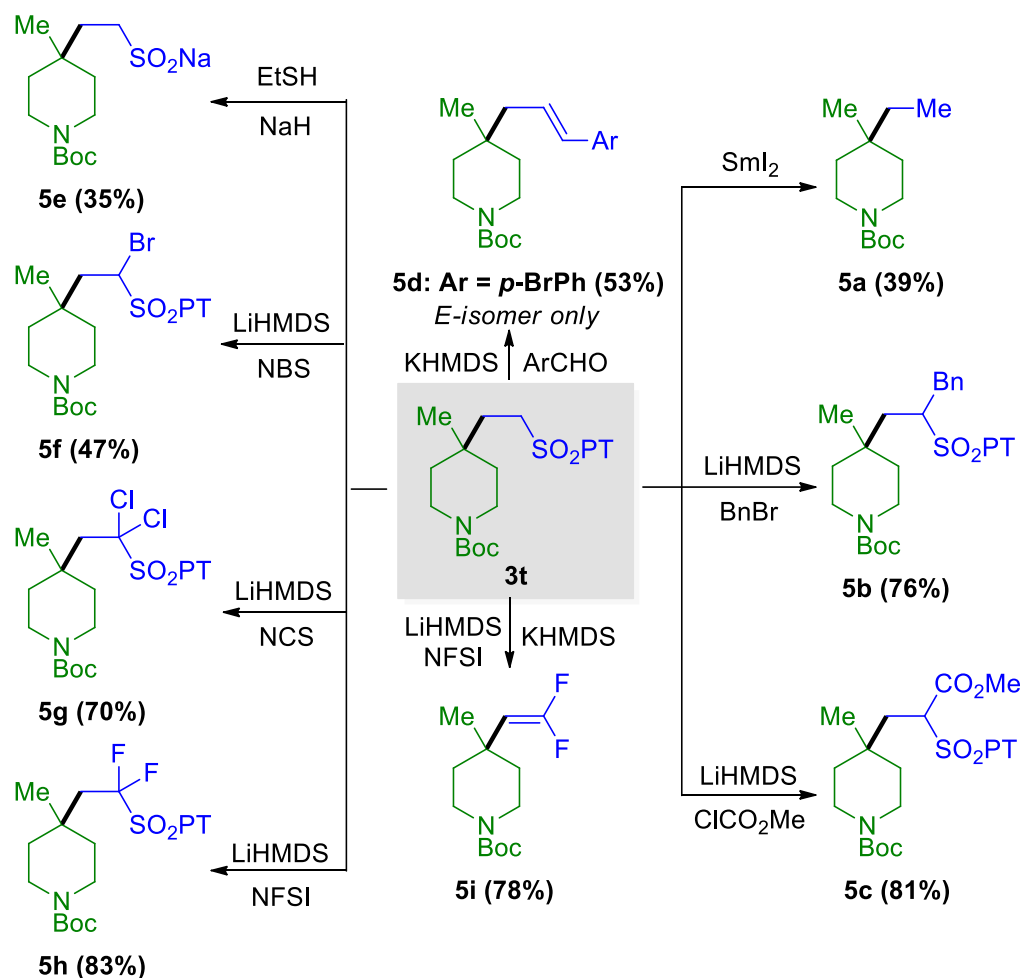
**Synthesis of the unactivated olefin 4****Synthesis of the PT sulfone 2d****Scheme A4.** Synthesis of the alkene and PT vinyl sulfone precursors in gram-scale.

Then, the iron-catalyzed cross-coupling of olefins **4** and **2d** was performed (**Scheme A5**). The synthesis of the alkene **4**, the PT vinyl sulfone **2d** and the coupling product **3t** were carried out in gram-scale.

**Scheme A5.** Iron-catalyzed hydroalkylation of olefin **4**, in gram-scale.

As expected, the PT sulfone thus incorporated was found to be a convenient handle for further reactions of adduct **3t**. The coupling product was subjected to precedented downstream operations to access a variety of congeners (**Scheme A6**).



Scheme A6. Diversification of product **3t**.

Taking advantage of the many known transformations of (hetero)arylsulfones, reductive desulfonylation of the C–S bond with  $\text{SmI}_2$ <sup>287</sup> led to the isolation of **5a**, the product of a net hydroethylation of an unactivated olefin. The position adjacent to the sulfone of **3t** could be alkylated or acylated under basic conditions to give **5b** and **5c**, respectively. The PT sulfone moiety of **3t** could be exploited in a Julia-Kocienski olefination<sup>288</sup> with *p*-bromobenzaldehyde to give **5d** as a single olefin isomer.

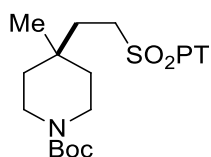
<sup>287</sup> Szostak, M.; Spain, M.; Procter, D. J. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 9155 – 9183.

<sup>288</sup> Blakemore, P. R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 23, 2563 – 2585.

Additionally, the heteroarene portion of the PT sulfone readily undergoes facile C(Ar)–S cleavage *via* a  $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$  reaction with  $\text{NaSEt}$  giving the sodium sulfinate salt **5e**, which itself is a radical precursor that can be used for further functionalization of heterocycles.<sup>289</sup> A range of  $\alpha$ -halogenations, including  $\alpha,\alpha$ -difluorination were also accomplished, giving **5f–5h**, and led to the development of a *one-pot* method, where  $\alpha$ -difluorination is followed by net elimination of *N*-phenyltetrazole sulfinic acid by treatment with  $\text{KHMDs}$ , to give the 1,1-difluoroalkene **5i**,<sup>290</sup> a structural unit of significant current interest. Thus, although not explicitly demonstrated here, further desulfonyl- or desulfinylative transformations of these functionalized products (e.g. sulfinate-heteroarene couplings), would allow for an exponential increase in the number of formal hydroalkylation products available from a single olefin of interest.

## 7.4. EXPERIMENTAL PROCEDURES

*tert*-Butyl 4-methyl-4-(2-((2-phenyl-2*H*-tetrazol-5-yl)sulfonyl)ethyl)piperidine-1-carboxylate (**3t**)



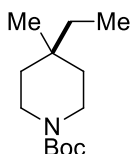
To a solution of *tert*-butyl 4-methylenepiperidine-1-carboxylate (**4**, 1.0 g, 5.07 mmol, 1.0 equiv), vinyl sulfone **2d**<sup>286</sup> (1.80 g, 7.60 mmol, 1.5 equiv), and  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  (30 mol%, 536 mg) in EtOH (0.2 M, 25 mL), was added  $\text{PhSiH}_3$  (94  $\mu\text{L}$ , 822 mg, 7.60 mmol, 1.5 equiv). The resulting mixture was heated to 60 °C with stirring for 1 h. The reaction mixture was then cooled to room temperature and diluted with brine. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with  $\text{Et}_2\text{O}$ . The organic layers were combined, washed with brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude material was then purified by silica gel column chromatography (2:8 EtOAc/hexane), supplying pure compound **3t** as a colorless oil (1.659 g, 3.80 mmol, 75%).  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.03 (s, 3H), 1.34–

<sup>289</sup> Gianatassio, R.; Kawamura, S.; Eprile, C. L.; Foo, K.; Ge, J.; Burns, A. C.; Collins, M. R.; Baran, P. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 9851 – 9855.

<sup>290</sup> Prakash, G. K. S.; Hu, J.; Wang, Y.; Olah, G. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5203 – 5206.

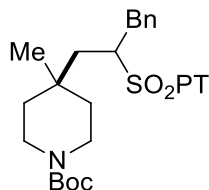
1.44 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.89–1.92 (m, 2H), 3.19–3.24 (m, 2H), 3.60–3.62 (m, 2H), 3.71–3.73 (m, 2H), 7.59–7.65 (m, 3H), 7.68–7.71 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 23.0, 28.6, 31.6, 33.2, 36.5, 39.6, 51.9, 79.7, 125.2, 129.9, 131.7, 133.1, 153.5, 154.9. HRMS ( $m/z$ ) calculated for  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 436.2013. Found: 436.2013. TLC:  $R_f$  = 0.40 (1:1 EtOAc/hexane).

***tert*-Butyl 4-ethyl-4-methylpiperidine-1-carboxylate (**5a**)**

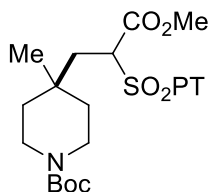


To a degassed solution of sulfone **3t** (65.3 mg, 150  $\mu\text{mol}$ , 1.0 equiv) in THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (10:1, 3.0 mL) was added  $\text{SmI}_2$  in THF (0.1 M, 9.0 mL, 900  $\mu\text{mol}$ , 6.0 equiv). The resulting light yellow solution was stirred at room temperature for 30 min and monitored via TLC. Upon completion, the reaction was quenched with a saturated aqueous solution of  $\text{NaHCO}_3$  and extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by silica gel column chromatography (1:10  $\text{Et}_2\text{O}$ /hexane) to furnish piperidine **5a** as a colorless oil (13.3 mg, 58.5  $\mu\text{mol}$ , 39%).  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.82 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 3H), 0.89 (s, 3H), 1.23–1.35 (m, 6H) 1.45 (s, 9H), 3.19 (ddd,  $J$  = 13.2, 9.2, 3.8 Hz, 2H), 3.48–3.57 (br s, 2H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.7, 22.9, 28.6, 31.4, 34.0, 36.5, 40.1, 79.3, 155.2. HRMS ( $m/z$ ) calculated for  $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{NO}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 228.1958. Found: 228.1959. TLC:  $R_f$  = 0.28 (1:10  $\text{Et}_2\text{O}$ /hexanes).

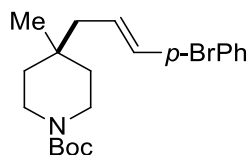
***tert*-Butyl 4-methyl-4-(3-phenyl-2-((2-phenyl-2*H*-tetrazol-5-yl)sulfonyl)propyl)piperidine-1-carboxylate (**5b**)**



To a solution of sulfone **3t** (43.5 mg, 100  $\mu$ mol, 1.0 equiv) in THF (500  $\mu$ L) at  $-78$   $^{\circ}$ C under Ar was added a solution of LiHMDS in THF (1 M, 220  $\mu$ L, 220  $\mu$ mol, 1.1 equiv). After stirring for 30 min at  $-78$   $^{\circ}$ C, a solution of benzyl bromide (13.1  $\mu$ L, 110  $\mu$ mol, 1.1 equiv) in THF (200  $\mu$ L) was added. The reaction mixture was stirred for an additional 30 min at  $-78$   $^{\circ}$ C, warmed to  $0$   $^{\circ}$ C over 1 h, and then stirred for 30 min at  $0$   $^{\circ}$ C. The reaction was quenched with a saturated aqueous solution of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by silica gel column chromatography (1:4 EtOAc/hexane) to furnish **5b** as a colorless oil (40.1 mg, 76.3  $\mu$ mol, 76%).  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.72 (s, 3H), 1.06–1.16 (m, 3H), 1.24–1.33 (m, 1H), 1.43 (s, 9H), 1.55 (dd,  $J = 15.5, 3.9$  Hz, 1H), 2.35 (dd,  $J = 15.6, 4.2$  Hz, 1H), 2.90 (dd,  $J = 14.1, 8.3$  Hz, 1H), 2.93–3.01 (m, 2H), 3.39 (dd,  $J = 14.1, 5.5$  Hz, 1H), 3.45–3.54 (m, 1H), 3.60 (br s, 1H), 4.09–4.15 (m, 1H), 7.21–7.29 (m, 5H), 7.58–7.65 (m, 5H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 22.3, 28.6, 32.0, 36.7, 38.0, 38.9, 63.0, 79.5, 125.5, 127.7, 128.9, 129.7, 129.8, 131.6, 133.1, 135.4, 153.3, 154.9. HRMS ( $m/z$ ) calculated for  $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 526.2483. Found: 526.2481. TLC:  $R_f = 0.42$  (1:4 EtOAc/hexane).

***tert*-Butyl 4-(3-methoxy-3-oxo-2-((2-phenyl-2*H*-tetrazol-5-yl)sulfonyl)propyl)-4-methylpiperidine-1-carboxylate (**5c**)**

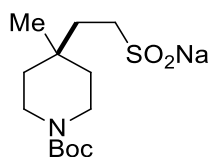
To a solution of sulfone **3t** (43.5 mg, 100  $\mu$ mol, 1 equiv) in anhydrous THF (500  $\mu$ L) at  $-78$   $^{\circ}$ C under Ar was added a solution of LiHMDS in THF (1 M, 400  $\mu$ L, 400  $\mu$ mol, 4.0 equiv). After 1 min, methyl chloroformate (15.5  $\mu$ L, 200  $\mu$ mol, 2.0 equiv) was added. The mixture was stirred at  $-78$   $^{\circ}$ C for 30 min, warmed to  $0$   $^{\circ}$ C over 1 h, and stirred at  $0$   $^{\circ}$ C for an additional 2 h. The reaction was quenched with a saturated aqueous solution of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with saturated  $\text{NaHCO}_3$  and brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by silica gel column chromatography (1:3 EtOAc/hexane) to furnish **5c** as a colorless oil (40.2 mg, 81.4  $\mu$ mol, 81%).  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.95 (s, 3H), 1.24–1.38 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 2.19 (dd,  $J = 14.4, 2.0$  Hz, 1H), 2.22 (dd,  $J = 14.4, 10.1$  Hz, 1H), 3.09–3.19 (m, 2H), 3.52–3.66 (m, 2H), 3.71 (s, 3H), 4.57 (br d,  $J = 9.7$  Hz, 1H), 7.57–7.62 (m, 5H), 7.63–7.66 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 22.6, 28.6, 32.2, 36.4, 37.3, 39.6, 54.0, 67.5, 79.8, 126.0, 129.7, 131.8, 133.0, 152.7, 154.9, 165.4. HRMS ( $m/z$ ) calculated for  $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 494.2068. Found 494.2065. TLC:  $R_f = 0.24$  (1:3 EtOAc/hexane).

***tert*-Butyl (E)-4-(3-(4-bromophenyl)allyl)-4-methylpiperidine-1-carboxylate (**5d**)**

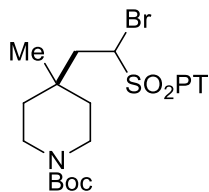
To a solution of sulfone **3t** (43.6 mg, 100  $\mu$ mol, 1.0 equiv) and *p*-bromobenzaldehyde (20.4 mg, 110  $\mu$ mol, 1.1 equiv) in THF (1.0 mL) at  $-78$   $^{\circ}$ C was

added a solution of KHMDS in PhMe (0.5 M, 240  $\mu$ L, 120  $\mu$ mol, 1.2 equiv). The resulting mixture was stirred at  $-78^{\circ}\text{C}$  for 30 min and then warmed to room temperature over 2 h. The reaction was quenched with a saturated aqueous solution of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and extracted with  $\text{Et}_2\text{O}$ . The combined organic layers were washed with brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by silica gel column chromatography (1:10  $\text{Et}_2\text{O}$ /hexane) to furnish the *E* olefin **5d** exclusively as a colorless oil (20.8 mg, 52.7  $\mu$ mol, 53% yield).  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.98 (s, 3H), 1.29–1.36 (m, 2H), 1.39–1.44 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 2.16 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 3.22 (ddd,  $J = 13.3, 9.3, 3.7$  Hz, 2H), 3.58 (br s, 2H), 6.21 (dt,  $J = 15.2, 7.5$  Hz, 1H), 6.32 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H), 7.19–7.21 (m, 2H), 7.40–7.42 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 23.8, 28.6, 32.6, 36.8, 40.0, 45.3, 79.4, 120.8, 127.3, 127.7, 131.7, 136.6, 155.2. Peak overlapping was observed. HRMS ( $m/z$ ) calculated for  $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{BrNO}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 394.1376. Found: 394.1379. TLC:  $R_f = 0.43$  (1:10  $\text{Et}_2\text{O}$ /hexane).

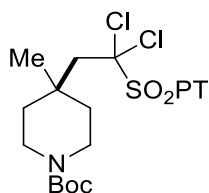
**Sodium 2-(1-(*tert*-butoxycarbonyl)-4-methylpiperidin-4-yl)ethane-1-sulfinate (5e)**



To a solution of sulfone **3t** (43.6 mg, 100  $\mu$ mol, 1.0 equiv) in MeOH (1.5 mL) was added NaOMe (21.6 mg, 400  $\mu$ mol, 4 equiv) under Ar. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1.5 h, after which AcOH (35  $\mu$ L, 600  $\mu$ mol, 6 equiv) was added. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and then azeotroped with PhMe. The crude material was purified by silica gel column chromatography ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow 1:9$  MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow 1:3$  MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{MeOH}$ ) to provide sodium sulfinate **5e** as a white solid (11.0 mg, 35.1  $\mu$ mol, 35% yield). Mp.:  $225^{\circ}\text{C}$  (decomp).  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 0.98 (s, 3H), 1.35–1.43 (m, 4H), 1.46 (s, 9H), 1.72–1.74 (m, 2H), 2.90–2.93 (m, 2H), 3.30 (br s, 2H), 3.57 (br s, 2H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 22.1, 27.5, 27.7, 30.5, 35.1, 35.8, 46.2, 81.5, 156.7. HRMS ( $m/z$ ) calculated for  $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{NNaO}_4\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 314.1396. Found: 314.1399. TLC:  $R_f = 0.33$  (1:9 MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

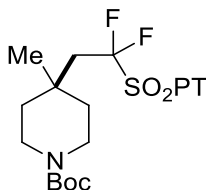
***tert*-Butyl 4-(2-bromo-2-((2-phenyl-2*H*-tetrazol-5-yl)sulfonyl)ethyl)-4-methylpiperidine-1-carboxylate (**5f**)**

To a solution of sulfone **3t** (218 mg, 500  $\mu$ mol, 1 equiv) in THF (500  $\mu$ L) at  $-78$   $^{\circ}$ C under Ar was added a solution of LiHMDS in THF (1M, 1.75 mL, 1.75 mmol, 3.5 equiv) dropwise. After 15 min, *N*-bromosuccinimide (267 mg, 1.50 mmol, 3.0 equiv) was added and the mixture was stirred at  $-78$   $^{\circ}$ C for 50 min, warmed to room temperature, and stirred for additional 2 h. The reaction mixture was quenched with a saturated aqueous solution of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by silica gel column chromatography (1:4 EtOAc/hexane) to furnish **5f** as a colorless oil (121.4 mg, 236  $\mu$ mol, 47%).  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.11 (s, 3H), 1.35–1.41 (m, 1H), 1.42–1.49 (m, 11H), 1.53 (ddd,  $J = 13.5, 9.4, 4.2$  Hz, 1H), 2.18 (dd,  $J = 15.8, 9.0$  Hz, 1H), 2.64 (dd,  $J = 15.8, 1.7$  Hz, 1H), 3.18–3.25 (m, 2H), 3.60 (br s, 2H), 5.27 (dd,  $J = 9.0, 1.8$  Hz, 1H), 7.60–7.62 (m, 4H), 7.68–7.64 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 23.2, 28.6, 32.7, 36.7, 39.5, 41.2, 60.0, 79.8, 125.9, 129.7, 131.9, 132.9, 151.6, 154.9. HRMS ( $m/z$ ) calculated for  $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{BrN}_5\text{O}_4\text{S}$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^{+}$ : 514.1118. Found 514.1121. TLC:  $R_f = 0.38$  (1:4 EtOAc/hexane).

***tert*-Butyl 4-(2,2-dichloro-2-((2-phenyl-2*H*-tetrazol-5-yl)sulfonyl)ethyl)-4-methylpiperidine-1-carboxylate (**5g**)**

To a solution of sulfone **3t** (87.1 mg, 200  $\mu$ mol, 1 equiv) in THF (200  $\mu$ L) at  $-78$   $^{\circ}$ C under Ar was added a solution of LiHMDS in THF (1M, 700  $\mu$ L, 700  $\mu$ mol, 3.5 equiv). After 15 min, *N*-chlorosuccinimide (80.1 mg, 600  $\mu$ mol, 3.0 equiv) was added, and the mixture was stirred at  $-78$   $^{\circ}$ C for 50 min, warmed to room temperature, and stirred for additional 2 h. The reaction mixture was quenched with a saturated aqueous solution of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and the extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by silica gel column chromatography (1:4 EtOAc/hexane) to furnish dichloride **5g** as a yellow oil (70.1 mg, 139  $\mu$ mol, 70% yield).  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.32 (s, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.55–1.63 (m, 2H), 1.65–1.74 (m, 2H), 2.81 (s, 2H), 3.13–3.25 (m, 2H), 3.63–3.72 (m, 2H), 7.53–7.56 (m, 2H), 7.57–7.62 (m, 2H), 7.64–7.68 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 23.3, 28.6, 35.1, 38.1, 39.4, 48.7, 79.8, 101.0, 126.5, 129.5, 131.9, 133.3, 149.7, 154.9. HRMS ( $m/z$ ) calculated for  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 504.1234. Found: 504.1236. TLC:  $R_f$  = 0.33 (1:4 EtOAc/hexane).

***tert*-Butyl 4-(2,2-difluoro-2-((2-phenyl-2*H*-tetrazol-5-yl)sulfonyl)ethyl)-4-methylpiperidine-1-carboxylate (**5h**)**

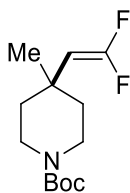


To a solution of sulfone **3t** (174 mg, 400  $\mu$ mol, 1 equiv) in THF (500  $\mu$ L) at  $-78$   $^{\circ}$ C under Ar was added a solution of LiHMDS in THF (1M, 1.2 mL, 1.2 mmol, 3.0 equiv). After 15 min, a solution of *N*-fluorobenzenesulfonimide (378 mg, 1.2 mmol, 3.0 equiv) in THF (3.5 mL) was added, and the mixture was stirred at  $-78$   $^{\circ}$ C for 50 min, warmed to room temperature, and stirred for additional 50 min. The reaction mixture was quenched with a saturated aqueous solution of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and the extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by silica gel column chromatography (1:4 EtOAc/hexane) to furnish difluoride **5h** as a colorless oil 157.3 mg, 332  $\mu$ mol, 83% yield).  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):



1.17 (s, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.46–1.49 (m, 2H), 1.56 (ddd,  $J = 13.6, 10.3, 5.6$  Hz, 2H), 2.32–2.43 (m, 2H), 3.18–3.25 (m, 2H), 3.53–3.61 (br, 2H), 7.51 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.59–7.62 (m, 2H), 7.65 – 7.69 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 23.5, 28.6, 32.9, 37.4, 38.5 (t,  $J = 17.3$  Hz), 79.8, 126.2, 126.6, 128.6, 129.7, 132.0, 132.9, 149.5, 154.9.  $^{19}\text{F}$ -NMR (376 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): –97.21 (d,  $J = 19.5$  Hz, 2F). HRMS ( $m/z$ ) calculated for  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 472.1825. Found: 472.1827. TLC:  $R_f = 0.40$  (1:4 EtOAc/hexane).

***tert*-Butyl 4-(2,2-difluorovinyl)-4-methylpiperidine-1-carboxylate (**5i**)**



To a solution of sulfone **3t** (43.5 mg, 100  $\mu\text{mol}$ , 1.0 equiv) in THF (200  $\mu\text{L}$ ) at  $-78^\circ\text{C}$  under Ar was added a solution of LHMDS in THF (1 M, 200  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{mol}$ , 2.0 equiv). After 15 min, a solution of *N*-fluorobenzenesulfonimide (94.6 mg, 300  $\mu\text{mol}$ , 3 equiv) in THF (800  $\mu\text{L}$ ) was added, the mixture was stirred at  $-78^\circ\text{C}$  for 50 min and then warmed to room temperature. After stirring for 1.5 h, the reaction mixture was cooled to  $-78^\circ\text{C}$  and a solution of KHMDS in PhMe (0.5 M, 1.2 mL, 6.0 equiv) was added. The reaction mixture was stirred for 1 h at  $-78^\circ\text{C}$  and then quenched with a saturated aqueous solution of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by silica gel column chromatography (1:4 EtOAc/hexane) to give difluorovinyl **5i** as a yellow oil (20.3 mg, 77.7  $\mu\text{mol}$ , 78%).  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.13 (s, 3H), 1.32–1.40 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.62–1.65 (m, 2H), 3.01–3.05 (m, 2H), 3.71 (br s, 2H), 4.10 (dd,  $J = 29.2, 5.5$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 27.9 (m), 28.6, 31.4–31.6 (m), 37.7, 40.6, 79.5, 85.2 (dd,  $J = 19.7, 15.4$  Hz), 155.0, 155.5 (dd,  $J = 289.2, 282.7$  Hz).  $^{19}\text{F}$ -NMR (376 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): –84.68 (d,  $J = 49.4$  Hz, 1F), –85.79 (d,  $J = 49.4$  Hz, 1F). HRMS ( $m/z$ ) calculated for  $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{F}_2\text{NO}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 262.1613. Found: 262.1610. TLC:  $R_f = 0.67$  (1:4 EtOAc/hexane).

## 7.5. CONCLUSIONS

In summary, a strategy for the diversification of olefin-containing compounds through hydroalkylation has been described. This method relies upon application of the operationally simple iron-catalyzed reductive coupling developed in Prof. Baran's group to transform an array of carbon- and heteroatom-substituted olefins into alkyl heteroaryl sulfones through reaction with an optimized vinyl sulfone.<sup>281</sup>

I worked on the diversification of the resulting sulfone adducts *via* established sulfone chemistry. This approach can be useful in diversity-oriented synthesis and medicinal chemistry, where straightforward access to a range of products from an olefin-containing lead compound should be advantageous.

